

ROBSON LEANDRO SCHACKER

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DA SÉRIE
ÔMEGA 3 EM MEXILHÕES DA ESPÉCIE *Perna-perna* (L.)
POR CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

Florianópolis – SC

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DA SÉRIE
ÔMEGA 3 EM MEXILHÕES DA ESPÉCIE *Perna-perna* (L.)
POR CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

ROBSON LEANDRO SCHACKER

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Co-orientadora: Prof. Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães

FLORIANÓPOLIS – SC

2007

ROBSON LEANDRO SCHACKER

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DA SÉRIE
ÔMEGA 3 EM MEXILHÕES DA ESPÉCIE *Perna-perna* (L.)
POR CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em
Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, Fevereiro de 2007

Prof. Dr. Faruk Jose Nome Aguilera
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Orientador

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Prof. Dr. Antônio Carlos Joussef

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho contou com a participação de pessoas especiais, as quais agradeço a colaboração; são elas:

- Prof. Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães
- Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
- João Renato de Mendonça Strelau
- Luciano Henrique Campestrini
- Gilmar Conte
- Angelo Ruzza
- Cesar Alexandro de Silva
- Funcionários da Central de Análises
- Membros da Banca

Agradeço especialmente à família, pelo apoio, carinho e compreensão.

*Aos meus pais Pedro e Janete
pelo amor, carinho e dedicação;
sentimentos cujo significado não
tenho palavras suficientes para
descrever.*

*Aos familiares pelo apoio e
incentivo.*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. Gorduras.....	8
2.2. Lipídios.....	9
2.3. Ácidos orgânicos e graxos.....	12
2.4. Ácidos graxos saturados.....	13
2.5. Ácidos graxos insaturados.....	15
2.5.1. Ácidos graxos monoinsaturados.....	16
2.5.2. Ácidos graxos di-insaturados.....	17
2.6. Ácidos graxos polinsaturados e a rancidez oxidativa.....	18
2.6.1. família ômega-3.....	21
2.7. Bivalves como fonte de ômega-3.....	23
2.7.1. Classe bivalvia.....	24
2.7.2. Mexilhões.....	25
2.8. Análise de ácidos graxos de lipídios.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Amostras.....	29
3.1.1. Apresentação das amostras.....	29
3.1.2. Aquisição das amostras.....	29
3.1.3. Coleta.....	30
3.1.4. Separação tecido-valva.....	31
3.1.5. Processamento prévio das amostras pós-coleta.....	32
3.2. Materiais e equipamentos da extração.....	33
3.3. Padrões de análise.....	34
3.4. Equipamentos de análise.....	34
3.5. Limpeza da vidraria.....	35
3.6. Preparo e extração das amostras para análise.....	36
3.6.1. Extração dos lipídios totais (Etapa 1).....	36

3.6.2. Saponificação e separação dos neutros (Etapa 2).....	37
3.6.3. Preparação dos ésteres metílicos (Etapa 3).....	39
a) Sub-etapa 3.1. Esterificação com reagente BF_3 em metanol.....	39
b) Sub-etapa 3.2. Esterificação com reagente cloreto de acetila em metanol.....	41
3.7. Testes prévios.....	42
3.8. Testes de fracionamento dos extratos.....	42
3.9. Injeções.....	43
3.9.1. Injeções das porções extraídas nos testes.....	44
3.9.2. Preparo e injeção dos padrões.....	44
3.9.3. Injeção das amostras.....	46
3.9.4. Injeção das amostras para identificação por espectro de massas.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. Classificação de amostragem.....	47
4.2. Preparos pós-coleta.....	48
4.3. Padrões e equipamentos empregados.....	49
4.4. Procedimentos pré- análise.....	49
4.5. Injeções e dados com base nos testes prévios.....	50
4.6. Identificação por espectrometria de massas dos ésteres preparados.....	52
4.7. Identificação e quantificação por cromatografia gasosa dos ésteres preparados.....	57
4.7.1. Identificação e resposta quantitativa.....	57
4.7.2. Análise quantitativa das amostras.....	62
4.7.2.1. Comparação entre métodos de esterificação.....	63
4.7.2.2. Análise das amostras provenientes das quatro coletas.....	65
4.7.3. Interpretação dos resultados para as coletas.....	67
5. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	85
Anexo I. Fórmulas.....	86
Anexo II. Mapas.....	87
Anexo III. Local de coleta e espinheis.....	88
Anexo IV. Estrutura dos ésteres de ácidos graxos.....	89

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Características dos lipídios na alimentação.....	9
Tabela 2. Classificação dos lipídios.....	10
Tabela 3. Características e ocorrência dos principais ácidos graxos saturados.....	14
Tabela 4. Características e ocorrência dos principais ácidos graxos monoinsaturados.....	17
Tabela 5. Características dos mexilhões tomados como amostra.....	29
Tabela 6. Períodos e dados das coletas de mexilhões tomados como amostras.....	30
Tabela 7. Reagentes usados no procedimento de extração.....	33
Tabela 8. Padrões usados na análise do óleo de mexilhão.....	34
Tabela 9. Concentrações das soluções padrão, em mg L ⁻¹	45
Tabela 10. Ésteres identificados nas seis amostras analisadas por espectrometria de massas.....	57
Tabela 11. Fatores de resposta e médias para os padrões utilizados na verificação de resposta do detector.....	60
Tabela 12. Médias dos fatores de resposta para cada éster componente da mistura AOCS- 07N.....	61
Tabela 13. Dados para a comparação dos métodos de esterificação empregados nas duas frações das duas primeiras coletas.....	63
Tabela 14. Média dos valores médios (em percentagem) entre duplicatas para cada coleta de seis indivíduos.....	65
Tabela 15. Médias gerais das quatro coletas agrupadas.....	66
Tabela 16 - Médias dos valores médios de temperatura da água do mar baseados no mês anterior e atual da coleta.....	67

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de estrutura de um triglicerídeo.....	11
Figura 2. Reação de saponificação de um triglicerídeo.....	12
Figura 3. Biossíntese do ácido palmítico.....	13
Figura 4. Esquema da síntese dos ácidos polinsaturados da família ômega 6	19
Figura 5. Biossíntese dos ésteres de ácidos ômega-3	22
Figura 6. Representação da forma de fixação do mexilhão através do bisso.....	25
Figura 7. Etapa 1, fluxograma do procedimento de extração dos lipídios totais....	37
Figura 8. Etapa 2, fluxograma do procedimento de saponificação dos neutros.....	38
Figura 9. sub-etapa 3.1. fluxograma do procedimento de esterificação com BF ₃ /metanol.....	40
Figura 10. sub-etapa 3.2. fluxograma do procedimento de esterificação com cloreto de acetila/metanol.....	41
Figura 11. Cromatogramas de íons totais da mistura de ésteres do padrão AOCS- 007N (a) e de uma das amostras do extrato de mexilhão (b).....	53
Figura 12. Espectros de massas do pico de número 5 (cromatograma da figura 11) para o padrão AOCS-007N (a) e para a amostra (b).....	54
Figura 13. Espectros de massas do (a) éster metil <i>cis</i> -9,12-octadecadienoato (linoleato) disponível na biblioteca NIST, e (b) o espectro obtido de uma amostra de mexilhão.....	56
Figura 14. Cromatogramas da mistura de padrões AOCS-007N, analisados com coluna polar CBP20.....	59
Figura 15. Cromatograma parcial com a sequência para as amostras do óleo dos mexilhões.....	62
Figura 16. Gráfico de linha-coluna para os dados da Tabela 11.....	68
Figura 17. Médias dos percentuais agrupados por coleta.....	69
Figura 18. Gráfico de colunas e linhas em dois eixos para os ácidos ômega3.....	70
Figura 19. Gráfico de colunas e linhas em dois eixos com os valores de percentuais dos ácidos e coeficientes de variação.....	71
Figura 20. Gráfico de colunas para os valores dos coeficientes de variação dos ácidos em cada coleta.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AGPs	Ácidos graxos polinsaturados
AGT	Ácidos graxos <i>trans</i>
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLA	Ácido linoléico conjugado
CoA	Coenzima-A
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DIC	Detector por ionização em chama
EPA	Ácido eicosapentaenóico
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
PEG	Polietilenoglicol
PGI ₃	Prostaglandina
PTV	Programed Temperature Vaporization
TXA ₃ e TXA ₂	Tromboxano tipo A ₃ e A ₂
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

Estudos sobre a composição lipídica encontrada em determinadas espécies de organismos podem ser úteis na investigação dos processos metabólicos que ocorrem com esses organismos. O conhecimento sobre essa composição também contribui para o entendimento sobre as reações fisiológicas que a ingestão desses organismos pode causar na espécie humana. Atualmente, muito tem se falado sobre os benefícios causados pela ingestão de lipídios contendo ácidos da família ômega-3, não apenas no que diz respeito à prevenção de doenças, mas também no sentido de manutenção das funções corpóreas.

Com o objetivo de estudar a composição lipídica dos ácidos graxos em óleo de organismos marinhos, nesse trabalho é apresentada uma metodologia para preparar, identificar e determinar o percentual dos ácidos graxos presentes no óleo de mexilhões da espécie *perna perna*, coletados em diferentes períodos do ano, com o uso da cromatografia gasosa e a espectrometria de massas como técnicas analíticas. Foi dada ênfase na determinação dos ácidos graxos da família ômega-3 por causa de suas ações comprovadas no metabolismo humano. Os resultados obtidos permitiram testar a eficiência dos procedimentos empregados, criar um perfil para os ácidos ômega-3 e discutir algumas possíveis relações entre os percentuais desses ácidos e as variações de temperatura da água do mar, durante as coletas. Revelou-se com os resultados, que o perfil dos ácidos graxos dos mexilhões da espécie *perna perna* apresenta os ácidos: 14:0, 15:0, 16:0, 16:1 (n 6), 17:0, 18:0, 18:1 (n 9), 18:1 (n 7), 18:2 (n 6), 18:3 (n 3), 20:1 (n 9), 20:5 (n 3) e 22:6 (n 3). Foi encontrado uma quantidade significativa de ácidos ômega-3 (29 à 42%), embora ocorra uma grande quantidade de alguns ácidos saturados.

ABSTRACT

Studies regarding lipid composition of specific species can be useful for the investigation of metabolic processes occurring with these species. The knowledge about this composition also contributes to understand possible physiologic reactions that can occur with the ingestion of such organisms. The benefits to the human health brought by the ingestion of lipids rich with omega-3 acids are well known, particularly to prevent diseases.

The aim of this study was to develop a simple methodology to prepare, identify and determine by gas chromatography and mass spectrometry the percentage of fatty acids in the oil composition of mussels (*perna perna* species). The organisms were collected during different periods of the year. The results showed the relative distribution of fatty acids (omega-3) is dependent of the sea water temperature. The following saturated and poliunsaturated fatty acids were identified: 14:0, 15:0, 16:0, 16:1 (n 6), 17:0, 18:0, 18:1 (n 9), 18:1 (n 7), 18:2 (n 6), 18:3 (n 3), 20:1 (n 9), 20:5 (n 3) e 22:6 (n 3). In the mussel extracts the percentage of omega-3 fatty acids varied from 29 to 42%.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos sempre fizeram parte essencial da propagação da vida tanto para os homens como para outros seres vivos. Uma busca incessante pela sobrevivência tornou a alimentação uma prioridade em todas as formas de vida existentes em nosso planeta. Quando os homens primitivos começaram a utilizar suas mentes para criar utensílios, melhoraram suas habilidades para caçar e conseguir alimentos, começando assim uma odisséia para obter a sua dieta básica, sem a qual nossa espécie não cruzaria o umbral que nos fez evoluir. Guerras foram criadas para assegurar a sobrevivência dos povos e manter as suas necessidades alimentares. Hoje, quatro milhões de anos depois que um ser trocou as árvores pela savana, onde poderia buscar alimento com mais facilidade, ainda lutamos contra o mesmo inimigo, a falta de alimentos saudáveis para assegurar o bem estar de nosso corpo (Ordóñez, 2005).

Não é de hoje que se conhece a importância de uma alimentação saudável, também não é recente a preocupação das pessoas em cultivar e aprimorar novas categorias de alimentos. O topo da cadeia alimentar nos dias atuais, é constituído de uma infinidade de produtos, principalmente cereais como a soja, milho, feijão e outros. O Brasil evoluiu nos últimos anos em desenvolvimento da produção de grãos como os de soja e milho devido a trabalhos com melhoramento genético, que aumentaram a produtividade das lavouras; a genética é fundamental para a biotecnologia, cujos benefícios estão ligados com o desenvolvimento sustentável, que implica na maior produção de alimentos para suprir as carências nutricionais da população (Costa e Borém, 2003). Processos avançados de desidratação e refrigeração são usados atualmente para conservar os alimentos, mecanismos de controle de pH, pasteurização e esterilização viabilizam a atividade antimicrobiológica necessária para conservar os alimentos; fumaça e gases também são utilizados para o mesmo fim (Araújo, 1999). Pesquisas com melhoramento genético e conservação de alimentos estão corroborando para a qualidade de vida e disponibilidade de alimentos mais saudáveis na dieta, refletindo assim a importância de expandir o conhecimento sobre o potencial alimentar do planeta.

Talvez o legado da alimentação humana esteja nos oceanos, um ambiente ainda pouco explorado. Eles cobrem cerca de 70 % da superfície terrestre, suas águas contêm

uma enorme quantidade de organismos das mais variadas formas, que superam o ambiente terrestre em termos de classes ou filos. Somente o Brasil possui cerca de 8.000 km de litoral, tornando-o um país com privilégios na exploração dos recursos sustentáveis do mar (Mello e Palma, 2000). Nos oceanos podem ser encontrados animais com as mais variadas formas de alimentação, alguns deles são seres adaptados a condições extremas de captação de alimento como nas aberturas hidrotérmicas em locais de atividade vulcânica submarina. Essas fendas vulcânicas são ecossistemas repletos de moluscos que atingem grande tamanho corporal e são pouco estudados, alguns eram desconhecidos pela ciência até pouco tempo atrás. As habilidades dos animais marinhos viverem em condições que anteriormente não se acreditava que fossem possíveis, trazem uma nova perspectiva de como os oceanos são ricos em recursos ainda não aproveitados pelo homem (Nielsen, 2002).

Quando se fala em recursos alimentares dos oceanos, a primeira imagem que é formada na mente, com toda certeza é a do peixe, esse alimento rico nos tem dado sustento por muitas eras. Há décadas ele tem sido usado como fonte de vitaminas A e D, encontradas em grande quantidade no óleo do fígado. Porém, uma nova visão de alimento tem dado um grande impulso no consumo de peixe após o início do desenvolvimento da ciência nutricional; o peixe passou a ser considerado um alimento funcional, com um grande potencial nutritivo. A carne de peixe está sendo recomendada como fonte de proteína de alto valor biológico e o peixe inteiro como fonte de cálcio e fósforo. Devido à alta digestibilidade das proteínas, os peixes magros têm sido recomendados pelos médicos para pessoas que consomem grandes quantidades de carboidratos. Mas sem dúvida, o efeito mais marcante do consumo do peixe, reside no fato de conter baixo teor de colesterol e alto teor de ácidos graxos polinsaturados, sendo assim recomendado nas dietas especiais para pessoas com problemas das coronárias (O Lan online). Porém, os ácidos polinsaturados não são encontrados apenas em peixes, muitos organismos de origem marinha possuem uma grande quantidade desses ácidos, eles estão presentes em moluscos, crustáceos, mamíferos, microalgas e outros (Käkelä e Hyvärinen, 1998).

Nos últimos tempos têm-se verificado um interesse crescente em determinados alimentos, contendo componentes com atividades fisiológica e biológica, como os ácidos polinsaturados, chamados alimentos funcionais. O termo alimento funcional é usado para designar alimentos naturais ou processados contendo ingredientes que melhoram

determinadas funções corporais. A designação apareceu pela primeira vez na década de 80, para alimentos não modificados tais como a carne e leite, que representam os exemplos mais simples de alimentos naturais, considerados como funcionais, uma vez que são ricos nos componentes com atividade fisiológica como ácidos graxos ômega-3 e 6 (Mateus, 2002 e referências).

Na literatura pode ser encontrada uma série de informações sobre a ação de alguns ácidos graxos polinsaturados ômega-3 em certas etapas de desenvolvimento do ser humano. Esses ácidos podem ser provenientes diretamente da alimentação (produtos ricos em ácidos graxos polinsaturados ômega-3), como também ser formados a partir de precursores da mesma série metabólica presente em uma dieta. O consumo ou a ingestão dos precursores de uma série ômega-3 pode depender da etapa de desenvolvimento, do estado nutricional, das necessidades fisiológicas destes ácidos graxos e das necessidades por parte de tecidos específicos do corpo, como membranas ou órgãos (Borges e Waitzberg, 1995).

Ácidos graxos das famílias ômega 3 e 6 são considerados essenciais, pois não podem ser sintetizados pelo organismo humano. Existem diversas fontes desses ácidos, mas é em organismos de origem marinha que os ácidos graxos polinsaturados ômega -3 são relativamente abundantes. Eles são sintetizados pelas algas, micro-algas e componentes do fitoplâncton, a partir de precursores de menor tamanho molecular, pois tais organismos têm a capacidade de alongar e dessaturar (introduzir duplas ligações) os ácidos graxos com estruturas simples (Chaney, 1998).

Para animais de origem marinha como crustáceos e bivalves, a presença desses ácidos essenciais deve-se a capacidade que esses organismos têm em metabolizá-los a partir de precursores de menor complexidade, como é o caso do ácido alfa linolênico, precursor da série ômega-3, que pode ser incorporado aos tecidos destes animais como parte da dieta ou também pode ser sintetizado por eles (CUNHA, 2001 e referências).

Segundo referências como Jorge *et al.* (1997), a possibilidade de que o aumento do consumo de ácidos polinsaturados ômega-3, principalmente os metabólitos EPA e DHA, possam interagir contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, decorreu das observações de Bang *et al.* (1976) e Dyerberg *et al.* (1975), considerando a baixa incidência de doenças cardiovasculares em esquimós da Groenlândia que ingeriam altos teores de

ácidos graxos polinsaturados, principalmente ômega-3, na sua alimentação. As causas propostas para esse fenômeno incluem desde modificações favoráveis nos níveis de lipídios plasmáticos, alterações hepáticas no metabolismo do colesterol, até redução da captação do colesterol pelo fígado. Posteriormente os estudos que avaliaram o efeito do EPH e DHA sobre o perfil lipídico, de um modo geral, demonstraram redução das VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa) e da trigliceridemia. Entretanto, o principal efeito dos ácidos graxos ômega-3 sobre as doenças coronárias parece estar ligado a sua ação sobre a agregação plaquetária, redução na produção de um forte agente agregador (TXA₂) que forma coágulos. Os ácidos desta família podem colaborar também com a prevenção de doenças, como câncer de mama, próstata, cólon, eczemas e psoríase, inflamações e hipertensão além de evitar artrites e ajudar na formação de tecidos de alguns órgãos e do cérebro (Connor, 2000) (Pardini *et al.*, 2005 e referências).

Morelato (1998) e Moschen (2000) trabalharam, respectivamente, com o uso de enriquecimento dos ácidos polinsaturados na ração de suínos e larvas de várias espécies de peixes cultivadas industrialmente. É uma prática comum a utilização do procedimento chamado de enriquecimento de ração, em que se incorporam nutrientes ao alimento antes deles serem fornecidos aos animais; também pode ocorrer enriquecimento em larvas que serão consumidas vivas. Alimentos enriquecidos com EPA e DHA são empregados com grande sucesso na larvicultura, melhorando a sobrevivência, crescimento e metamorfose de várias espécies de animais cultivados. Contribui também para uma menor incidência de deformações, melhora na pigmentação e na resistência ao estresse.

Uma fonte de ácidos polinsaturados, que ainda não é utilizada com frequência, são os moluscos marinhos (ostras e mexilhões). Eles possuem uma considerável quantidade desses ácidos, porém seu consumo, comparado com o peixe, ainda é pequeno. Não existe um hábito alimentar de ingerir carne de moluscos, por isso, receitas a base desses animais não aparecem com frequência na mesa dos brasileiros. A gordura do mexilhão ou da ostra também pode ser utilizada para enriquecimento de rações, como as empregadas nos trabalhos citados acima. Uma vantagem que o uso dos moluscos traria é diminuição da pesca predatória, pois tanto o mexilhão quanto a ostra podem ser criados em cativeiros apropriados ao longo da costa.

Da mesma forma que o peixe, o consumo de ostras e mexilhões não é algo recente, tanto o cultivo como o hábito de comer moluscos, já figurava entre os primeiros povos civilizados do mundo; os romanos por exemplo, exploravam o comércio de caracóis e possuíam escravos para cuidá-los. Foi um romano, Sergius Orata, quem primeiro teve a idéia de fazer um parque para criação de ostras. Conta-se que, para receber Marco Antônio, Cleópatra mandou preparar um banquete, no qual serviu ao general romano seu prato preferido, uma sopa de mariscos regada a vinho branco. Desde o tempo dos romanos, em Portugal já se utilizavam métodos para conservação de frutos do mar, ostras e mexilhões eram conservados em barris, para consumo futuro. Na época da independência dos Estados Unidos, os imigrantes franceses que se estabeleceram no litoral criaram um prato de mariscos que é famoso até hoje. No Brasil colonial, relatos antigos revelam que os povos indígenas consumiam marisco e ostras com frequência, um hábito que se conservou até os dias atuais, porém em pouca escala devido à facilidade de obtenção do peixe, na pesca predatória industrial (Ornellas, 2000).

Na Espanha o cultivo de moluscos como atividade econômica, foi estabelecido na década de 40 e espalhou-se por toda a Europa, Ásia e América do Sul. No Brasil, as primeiras pesquisas datam da década de 60. Hoje a produção de bivalves está centrada nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, representando uma atividade com grande perspectiva de desenvolvimento comercial. A espécie *perna-perna* merece destaque nesse contexto, sendo considerado como um dos mitilídeos de maior abundância no litoral brasileiro, este bivalve foi motivo de grande parte das pesquisas na área alimentícia realizadas com moluscos dessa família (Salán, 2005). O mexilhão *perna-perna* tem sido utilizado também em pesquisas de cunho ambiental, como biomarcador de poluição por metais ou microorganismos, mas pouco tem se estudado sobre a composição de sua gordura, apenas no que diz respeito à quantidade total de lipídeos (Tramonte *et al.*, 2003). São raros os trabalhos que incluem uma análise do perfil lipídico desse bivalve, normalmente apenas a quantidade total de lipídios é informada como dado nutricional; porém, a qualidade dos lipídios é demonstrada apenas com o estudo do perfil dos ácidos graxos. Segundo Medeiros (2001), que estudou o mexilhão *Perna-perna*; a composição dos ácidos ômega 3 nesse organismo pode chegar a 32,21 % na fêmea, se for considerado os percentuais dos ácidos graxos comumente encontrados em óleo animal. Este valor

encontrado é relativamente alto se comparado com outros animais marinhos (Maia *et al.*, 1993). Portanto, o mexilhão é um organismo que possui uma considerável quantidade de ômega 3, segundo essa referência. Com a divulgação de estudos sobre polinsaturados em mexilhões *Perna-perna*, pode-se abrir caminho para outros tipos de utilização desse bivalve, como a extração do óleo ou de alguns ácidos graxos especificamente.

A análise da composição da gordura ou óleo de organismos como o mexilhão, peixe e outros, é um processo delicado que envolve uma série de procedimentos analíticos. Quem recebe um laudo de composição percentual de gordura, muitas vezes, não imagina quantos procedimentos diferentes são aplicados para se chegar a um resultado satisfatório. Normalmente o trabalho de extração, preparo, injeção e análise dos resultados leva semanas para ser realizado. Como um exemplo da complexidade da metodologia aplicada, pode ser citado os métodos padrões AOAC (1995) e normas analíticas do instituto Adolfo Lutz (1985), que são normalmente adotados pela legislação e utilizados pela indústria. Muito embora existam outras metodologias, as duas citadas acima são as mais utilizadas em trabalhos de pesquisa e ambas concordam que, para fins de análise, a técnica com resultados mais precisos é a cromatografia gasosa. Para tal, utiliza-se um cromatógrafo equipado com detector por ionização em chama e uma coluna de polietilenoglicol (PEG), considerada como a de melhor separação para os ésteres metílicos preparados dos ácidos graxos. A aparelhagem básica não difere muito, porém alguns acessórios podem ser úteis tanto na identificação como na quantificação; um espectrômetro de massas e o uso de padrões são bons exemplos disso (Eder, 1995). Portanto, existem inúmeras possibilidades de aperfeiçoar algumas das metodologias mais conhecidas, simplesmente mudando acessórios no equipamento. Outra forma de obter um resultado satisfatório é melhorar os procedimentos de extração e derivatização que são empregados rotineiramente de forma que seja possível extrair mais gordura com menos interferentes, assim como realizar derivatizações que não causem dúvidas durante a quantificação. Este último é de importância fundamental para a precisão dos resultados.

Pode-se dizer então que a cromatografia gasosa é um método analítico essencial para o trabalho com ácidos graxos proveniente de óleos e graxas e a eficiência desse método é o que faz com que supere todos os outros. Considerando todos estes fatos, o presente trabalho tem por finalidade avaliar o perfil lipídico do óleo de mexilhão,

empregando uma série de procedimentos para a obtenção, preparo, identificação e quantificação dos ésteres provenientes dos ácidos graxos que compõem esse óleo. Também são relatados aqui detalhes dos procedimentos de identificação por espectrometria de massas, que são de extrema importância para uma identificação positiva dos diferentes ácidos presentes. O mesmo é válido para a parte de quantificação por cromatografia gasosa, na qual a avaliação da resposta do detector consiste na precisão dos resultados almejados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gorduras

A rotina diária dos seres vivos requer um grande consumo de energia. As gorduras geram mais do que o dobro de energia que os carboidratos, por isso são mais adequadas ao armazenamento de reservas energéticas. Para animais que não se movem como ostras e mariscos, o glicogênio faz o papel de substância de reserva, e a gordura é ocupada para outras funções metabólicas. Para animais que se movem como as aves migratórias, o total de gordura pode atingir 40 a 50 % do peso corpóreo. A migração das aves seria impossível sem a gordura que fornece o combustível para seu movimento, pois o armazenamento de glicogênio é associado a grande quantidade de água nas células, o que corresponderia a uma massa corpórea maior, dificultando a movimentação pelo ar. Para o homem, as gorduras tem um importante papel na dieta, pois como alimento fazem com que uma refeição provoque maior plenitude gástrica, causando uma sensação de saciedade e aumentando o sabor dos alimentos. As gorduras possuem várias funções no organismo, são componentes do tecido adiposo, que serve de isolamento e proteção dos órgãos internos, e funcionam como veículos para o transporte de vitaminas lipossolúveis (Marzzoco e Torres, 1999; Nielsen, 2002).

As gorduras e outras substâncias gordurosas são classificadas na categoria de lipídios, devido ao fato de possuírem insolubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos, como clorofórmio, éter e outros.

As gorduras são constituídas principalmente por misturas de triglicerídios, que contêm ácidos graxos com diferentes números de insaturações e tamanhos de cadeias. Gorduras que possuem ácidos graxos com cadeias menores ou mais insaturadas tendem a formar pontos de fusão mais baixos; gorduras líquidas à temperatura ambiente são, em geral, chamadas de óleos (Mitchell *et al.*, 1978).

Animais marinhos, algas e plâncton possuem lipídios ricos em ácidos graxos polinsaturados de cadeias longas (20-22 átomos de carbono). Os óleos desses organismos

tendem a formar complexos arranjos de ácidos graxos com composição variável. Fatores ambientais e metabólicos como as diferentes estações do ano, tipo de alimentação, localização geográfica e tipo característico de espécie, influenciam na variação dos percentuais desses ácidos. Segundo referências que comentam o caso particular do óleo de peixe, a faixa de variação do EPA pode ser entre 4 e 30% e o DHA entre 2 e 25%. Estes dois ácidos graxos representam os polinsaturados de maior importância entre os lipídios oriundos de organismos marinhos (Rego, 2003 e referências).

2.2. Lipídios

Compostos relacionados com gorduras, óleos e ceras são constituídos por lipídios das mais diferentes classificações. Há compostos lipídicos polares que constituem algumas membranas e outros apolares que integram as mais variadas funções corpóreas. No geral, os lipídios são classificados como grupos de compostos heterogêneos encontrados em alimentos e organismos que possuem propriedades em comum, incluindo a insolubilidade em água e a capacidade de ser usado pelos organismos vivos (Mahan, 1998).

Juntamente com as proteínas e carboidratos, os lipídios formam um grupo de macronutrientes que podem ser sintetizados pelo organismo, realizando funções energéticas, estruturais e hormonais. Os óleos das sementes, por exemplo, fornecem energia para a biossíntese dos processos de germinação das plantas; já as ceras protegem algumas espécies contra parasitas e previnem a evaporação excessiva de água (Raven *et al.*, 2001).

No âmbito alimentício, os lipídios possuem várias características apreciáveis que os tornam compostos de elevado valor nutricional, a presença deles em alguns alimentos é fundamental para fornecer o paladar e as qualidades físicas, como pode ser observado na Tabela 1 (Dutra e Marchini, 2003).

Tabela 1- Características dos lipídios na alimentação

Características dos lipídios em alimentos
<ul style="list-style-type: none"> Aparecem em inúmeros alimentos de interesse econômico, como leite e manteiga.

-
- Proporcionam o dobro de energia que os demais macronutrientes
 - São veículos para vitaminas que compõem diversos alimentos
 - Melhoram a palatabilidade dos alimentos
 - Diminuem o volume da alimentação
 - Aumentam o tempo de digestão
 - Fornecem ácidos graxos essenciais
-

A diferença entre as classes de lipídios está ligada a suas composições químicas e propriedades físicas. Uma das classes mais importantes de lipídios é a denominada por “lipídios simples”. Esta classe é de grande importância para a ciência nutricional, uma vez que inclui os triglicerídeos, sendo estes os constituintes de maior proporção nos óleos de origem natural. A classificação geral para todos os lipídios pode ser encontrada na Tabela 2.

Tabela 2- Classificação dos lipídios

a) Simples:

- Ácidos graxos
- Gorduras neutras: ésteres de ácidos graxos com glicerol mono, di e triglicerídeos
- Ceras: ésteres de ácidos graxos com álcool de alto peso molecular
ésteres esterol (ex: éster colesterol)
éster não esterol (ex: ésteres de vitamina A)

b) Compostos:

- Fosfolipídios
- Glicolipídio
- Lipoproteína

c) Derivados de álcoois (esteróis e hidrocarbonetos)

Os triglicerídeos são compostos derivados de ésteres de ácidos graxos com o glicerol. Na natureza os triglicerídeos encontram-se na forma mista, sendo que os três ácidos ligados ao glicerol são diferentes ou somente dois são iguais. A estrutura de um

triglicerídeo está representada na Figura 1, para exemplificar o formato complexo da molécula.

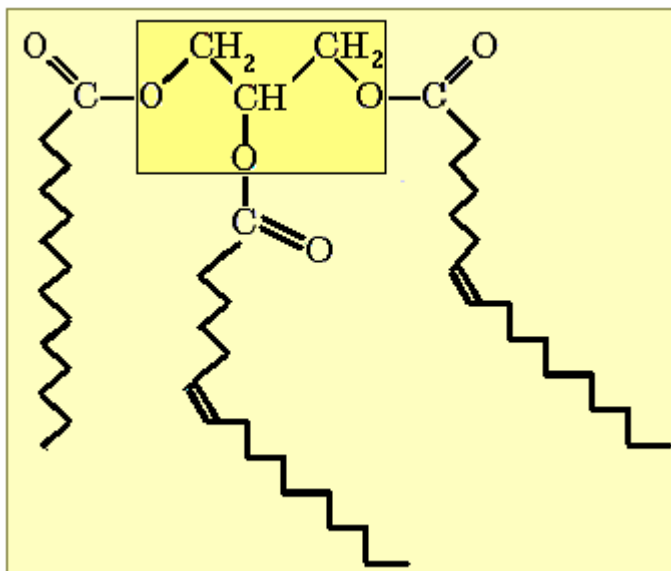


Figura 1. Exemplo de estrutura de um triglicerídeo.

A digestão dos lipídios ingeridos pelos organismos ocorre no trato gastrointestinal, onde são emulsificados, hidrolisados e absorvidos. Devido a pouca solubilidade dos lipídios em meio aquoso, sua incorporação é prejudicada por formarem grandes aglomerados, dificultando a ação das enzimas. Para facilitar a digestão são liberados sais biliares no intestino, empregados como agentes emulsificantes; a parte apolar desses sais interage com os lipídios hidrofóbicos, que são finalmente dispersos no meio aquoso. Algumas enzimas hidrolíticas, como as lipases, promovem a hidrólise para uma posterior absorção dos ácidos graxos pelas células do intestino (Hopfer, 1998; Berg *et al.*, 2002).

Fora do organismo a reação de hidrólise dos triglicerídeos pode ser realizada com o emprego de hidróxido de sódio ou potássio, que produz o glicerol e uma mistura de sais de ácidos carboxílicos de cadeias longas; esta reação recebe o nome particular de saponificação. A representação da reação de saponificação pode ser visualizada na Figura 2.

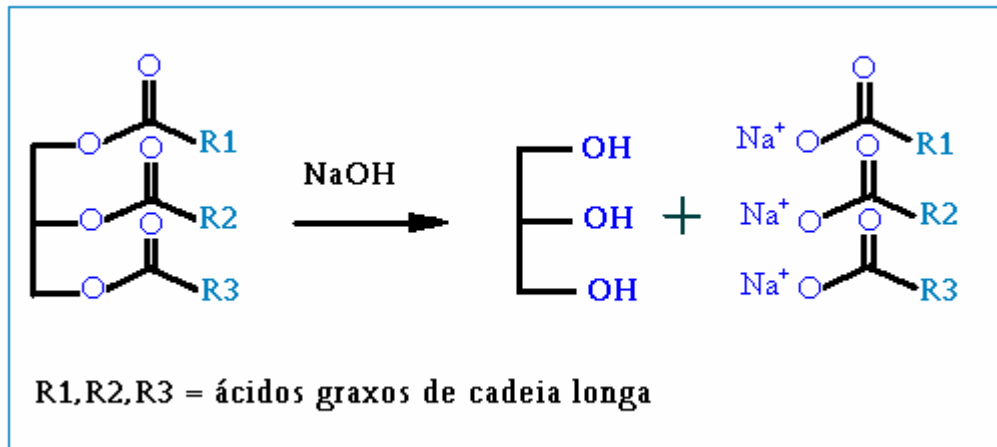


Figura 2. Reação de saponificação de um triglicerídeo

2.3. Ácidos orgânicos e graxos

Para a química, os ácidos sempre tiveram elevado valor como objeto de estudo. Carl Wilhelm Scheele, um renomado químico sueco, realizou a descoberta de vários compostos de natureza ácida em meados de 1786. Dentre os 15 a 20 mil experimentos atribuídos a ele, está a descoberta dos ácidos carboxílicos como o ácido tartárico e outros, embora o ácido fórmico já fosse conhecido desde 1500 (Fiorucci *et al*, 2002).

Ácidos graxos possuem, em geral, de 4 a 24 átomos de carbono unidos a um grupo carboxila único. Também são as unidades fundamentais da maioria dos lipídios existentes nos óleos e gorduras. Diferenciam-se entre si pela extensão da cadeia, presença e posição das duplas ligações. Os de cadeia menor são solúveis em água, mas com o aumento do comprimento da cadeia esta propriedade diminui. Não ocorrem livremente nas células, mas sim combinados a diferentes classes de lipídios, a partir dos quais podem ser liberados por hidrólise química ou enzimática. Quando encontrados na natureza, quase sempre apresentam cadeias lineares e um número par de átomos de carbono. Essas condições refletem o caminho percorrido em sua rota biossintética, pela qual é formado inicialmente o ácido palmítico (saturado com 16 átomos de carbono), a partir do qual os outros ácidos são derivados.

A biossíntese dos ácidos graxos é de grande importância para o estudo dos lipídios, pois a formação dos ácidos graxos deriva das condições metabólicas dos seres vivos; ela acontece principalmente no tecido adiposo, onde uma molécula de acetil-coenzima-A e sete moléculas de malonil-coenzima-A são reunidas para sintetizar o ácido palmítico (Lehninger, 1995; Alberts *et al.*, 2006). A reação simplificada é apresentada abaixo (Figura 3).

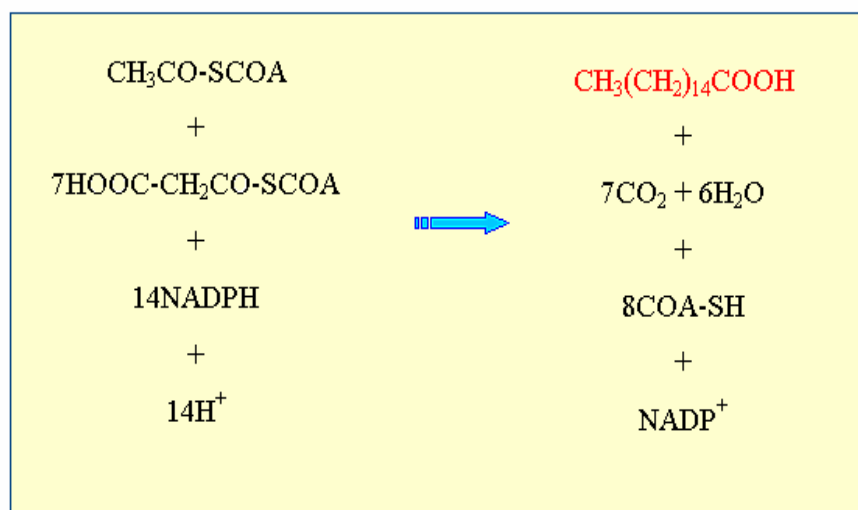


Figura 3. Biossíntese do ácido palmítico (lado superior direito, em vermelho).

2.4. Ácidos graxos saturados

Embora a maior parte dos ácidos graxos saturados utilizados pelos animais, principalmente os mamíferos, seja incorporada pela dieta, uma parte é produzida pela rota biossintética resumida na Figura 3. Entre os ácidos graxos saturados, de ocorrência em gorduras, destacam-se o ácido mirístico (com 14 átomos de carbono), o palmítico (com 16) e o ácido esteárico (com 18). Suas características e ocorrência podem ser observadas na Tabela 3 (Vianni e Braz-filho, 1996).

Tabela 3- Características e ocorrência dos principais ácidos graxos saturados

Ácidos	Características e ocorrência
Mirístico (14:0)	Componente de 15-30 % da gordura do coco e 16 % na semente de palma. Manteiga 9-11 % e 8-12 % da Gordura do leite. Gordura de baleia 8 %.
Palmítico (16:0)	Ocorre praticamente em toda gordura de origem animal e vegetal. Componente de 45 % do óleo de palma, 30-50 % no óleo de dendê. Óleo de semente de algodão 22 %,Banha e sebo 20-30 %. Gordura humana 25 % e de baleia 12 %. Óleo de amendoim 11 % e óleo de girassol 7 %.
Estearico (18:0)	Ocorre na maioria dos óleos vegetais. Componente de 38 % da manteiga do cacau e 12% do leite. Óleo de semente de linho 7 % e óleo de noz 5 %.

Os ácidos saturados compõem a maioria das gorduras sólidas e normalmente estão associados ao aumento do nível de colesterol, principalmente os ácidos mirístico e palmítico (Shcafer *et al.*, 2001). Os ácidos fazem diminuir os receptores de LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade, que são ricas em colesterol), aumentando a concentração do colesterol e dessa lipoproteína no sangue. Como são as LDL que transportam o colesterol para os tecidos periféricos, uma diminuição dos receptores implica na diminuição do processo degradativo dos mesmos (Williams, 1997).

Embora ocorra uma série de fatores que desincentivam o uso dos ácidos saturados na dieta, a presença desses ácidos em alguns alimentos é necessária para dar o sabor característico de cada variedade comercializada, como é o caso do queijo, no qual os saturados estão presentes em grande quantidade (Sanchez, 2004).

Para o metabolismo dos seres humanos, o ácido palmítico tem importante função, pois é o principal ácido produzido nos músculos esqueléticos e está envolvido com o fornecimento de energia, juntamente com o restante dos ácidos graxos; a queima de gordura

nesses músculos durante um forte esforço físico preserva outras fontes de energia, como o glicogênio que está presente em quantidade limitada; portanto os ácidos graxos possibilitam manter uma atividade física por tempo prolongado, sendo essenciais para a prática de exercícios (Curi, 2003).

Também de grande importância é o ácido esteárico, principalmente para os vegetais. No geral, ele pode aparecer em diversas partes da planta como nas células do caule, frutos e sementes estando ligado às várias formas de lipídios. É precursor do ácido oléico, outro ácido muito comum em óleos, cujos metabólitos são os ácidos considerados essenciais (Lopes *et al.*, 1999; Borges *et al.*, 2000).

2.5. Ácidos graxos insaturados

Ácidos graxos insaturados podem ser definidos como ácidos monocarboxílicos contendo uma ou mais ligações duplas entre dois carbonos localizados na porção hidrocarbônica da molécula.

No geral, tanto os ácidos saturados como os insaturados são representados pela simbologia que indica a letra “C”, seguida pelo número de carbonos totais dos ácidos e, no caso dos insaturados, o número de duplas-ligações antecedida por dois pontos: “:”, desta maneira o ácido palmítico que contém 16 carbonos e nenhuma insaturação é representado simplesmente por “C16:0” e o ácido oléico que contém 18 carbonos e uma insaturação é representado por “C18:1”; mas essa representação não traz informação sobre a posição da dupla-ligação, costuma-se utilizar a letra grega delta “ Δ ” seguida pelo sobrescrito com o número do carbono da dupla-ligação, (“ Δ^9 ” para o ácido oléico) (Wardlaw, 1995).

Outra forma de representação para a posição das duplas-ligações em ácidos insaturados considera uma característica comum entre alguns desses ácidos. Essa representação é baseada no carbono denominado ômega, que se localiza no final da cadeia hidrocarbônica que constitui o ácido, ou seja, o carbono terminal do lado oposto ao grupo carboxila. Aos ácidos que possuem a dupla ligação localizada no nono carbono (contados a partir do grupo metil terminal (carbono ômega)), designa-lhes o nome de ômega 9, que pode ser representado por “n-9”; esta representação levou ao agrupamento desses ácidos,

que podem ser mono, di ou polinsaturados, em séries ou famílias com o mesmo nome (ômega 9) (Moretto, 2002).

2.5.1. Ácidos graxos monoinsaturados

Nos ácidos graxos, o alongamento da cadeia e a dessaturação (inserção de duplas-ligações) são promovidos por uma série de complexas reações enzimáticas. Basicamente ocorre uma reação de alongamento, onde uma malonil CoA (coenzima-A) doa dois átomos de carbono para o novo ácido. Como a biossíntese produz primeiramente o palmitato, a malonil CoA leva a formação do estearato, esse por sua vez segue duas rotas possíveis: 1) continua sendo alongado até ácidos saturados de cadeias longas (20, 24 ou mais átomos de carbono); 2) pode ocorrer dessaturação para produzir ácidos mono, di ou polinsaturados. A dessaturação começa com o palmitato, porém isso conduz ao ácido palmitoleico (monoinsaturado do ácido palmítico (C16:0)); já o estearato conduz ao ácido oléico (C18:1) e daí, para os demais derivados insaturados (C18:2, 18:3 e etc.).

Os dois primeiros ácidos insaturados ($16:1(\Delta^9)$ e $18:1(\Delta^9)$) que resultam da dessaturação em sistemas biológicos de mamíferos, são pertencentes à família ômega 7 e 9 porque não existem enzimas para catalisar outras duplas-ligações entre os carbonos (ômega 7-9) e o agrupamento metila terminal (Campbell, 2000). As características e ocorrência dos ácidos mais importantes deste grupo podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4- Características e ocorrência dos principais ácidos graxos monoinsaturados

Ácidos	Características e ocorrência
Palmitoléico (16:1)	Seu percentual é normalmente baixo em óleos e gorduras. Óleo de baleia 7-18 % Banha 1-4 % e manteiga 2-6 % .
Oléico (18:1)	É amplamente distribuído na gordura natural Funciona como precursor do ácido linoléico e outros ácidos essenciais. Gordura de origem bovina e ovina 35-40 % e milho 35-50 %. Óleo de algodão 12- 40 % e mamona 5-10 %.
Erúico (22:1)	Encontrado no óleo de peixe (Arenque) 10-20 % Óleo de baleia 5-20% Colza 5 %

2.5.2. Ácidos graxos di-insaturados

São compostos que possuem duas insaturações ao longo da cadeia hidrocarbônica, alguns deles podem ser encontrados em algumas gorduras naturais, no entanto, o ácido mais abundante dessa categoria é o ácido linoléico (18:2). Os mamíferos não possuem a capacidade de produção desse ácido; os vegetais sim, a partir da dessaturação do ácido oléico (18:1 Δ^9). O isômero formado na dessaturação biossintética dos vegetais é normalmente o “*cis*-9,12”. Isso significa que as duplas-ligações se localizam nos carbonos 9 e 12, conforme a numeração oficial, que atribui uma seqüência crescente a partir do carbono da carboxila (número 1). Assim o isômero formado pode ser representado por 18:2 ($\Delta^{9,12}$). Esse ácido pertence à família ômega 6 e aparece constantemente em óleos vegetais como soja, milho, canola e outros. Sua predominância nos vegetais é evidente como mostra o trabalho de Reda *et al.* (2005) com as sementes de citros usados na fabricação de sucos, em que a quantidade atinge 43 % (ác. linoléico) do percentual de ácidos graxos identificados no limão.

Os animais marinhos e alguns microorganismos também produzem o ácido linoléico, mas para o homem ele é o primeiro de uma série de ácidos graxos essenciais necessários ao organismo e obtidos somente através da dieta. Ácidos graxos essenciais são

indispensáveis à saúde porque fazem parte da membrana celular, além de serem necessários para o transporte do colesterol, produção de energia, funcionamento do cérebro entre outras funções (Moura, 1998; Carvalho *et al.*, 2003 e referências).

Ácido linoléico conjugado ou CLA é o nome dado a uma mistura de isômeros do ácido linoléico (18:2 - $\Delta^{9,12}$), essa mistura inclui o ácido *cis*-9, *trans*-11; *trans*-7, *cis*-9 e *trans*-11, *cis*-13. São produtos da biohidrogenação do rúmen pela bactéria *butyrovibrio fibrisolvens* e estão presentes nas carnes de ruminantes e em produtos lácteos. Segundo Werner *et al.* (1992), o CLA possui uma atividade anticarcinogênica comprovada em cobaias, para vários tipos de tumores como leucemia, próstata e etc. Estudos como esses comprovam a utilidade dos ácidos di-insaturados, principalmente do ácido linolênico e seus derivados, na alimentação humana e animal.

2.6. Ácidos graxos polinsaturados e a rancidez oxidativa

O termo polinsaturado é empregado para nomear os ácidos graxos com mais de uma insaturação, isso inclui os ácidos di-insaturados. Porém, o termo é mais bem empregado para definir uma série de ácidos com várias insaturações, como é o caso dos derivados do ácido linolênico. São muito conhecidos pela abreviação em inglês de “polyunsaturated fat acids” (PUFAs) ou em português para ácidos graxos polinsaturados (AGPs). Duas das principais famílias de ácidos graxos polinsaturados de ocorrência natural são as ômega 3 e 6 (Anjo e referências, 2004). Ácidos dessas duas famílias são produzidos por alguns animais marinhos, algas, microalgas e vegetais, sendo dessaturados a partir dos metabólitos do ácido esteárico (saturado com 18 carbonos). A diferença entre os polinsaturados produzidos por vegetais e animais reside no tamanho da cadeia. Animais como peixes produzem ácidos graxos polinsaturados com cadeias longas, enquanto nos vegetais eles são de cadeias médias. São chamados de ácidos essenciais porque não podem ser sintetizados pelo organismo humano, que não possuem enzimas para sintetizar os ácidos linoléico (18:2 n 6) e linolênico (18:3 n 6 ou n 3). Após a ingestão e absorção desses ácidos na dieta, ocorre o alongamento e dessaturação até seus metabólitos de cadeia longa. Esse processo ocorre nos animais e nos homens, e representa importante papel nos seus metabolismos,

pois os ácidos produzidos interferem na atividade das enzimas ligadas às membranas além de uma série de outros fatores associados à presença dos AGPs. A síntese dos polinsaturados começa com a presença do ácido linoléico (18:2 n 6). Este por sua vez dá origem apenas aos metabólitos da família ômega 6, uma vez que as duas famílias ômega 6 e 3 não podem se interconverter no organismo humano. Os ácidos da família ômega 6 são encontrados em vários alimentos, principalmente o ácido linoléico (18:2 n 6) em óleos vegetais como soja, amendoim, açafrão e outros. O mais notável representante dessa família, o ácido γ -linolênico, está presente em grande quantidade em óleos como o de fígado de bacalhau. Também é possível encontrá-lo em microalgas verdes como a *Spirulinas* (Macedo e Alegre, 2001). Um esquema da síntese dos ácidos da família ômega 6 está representado na Figura 4, para os ésteres dos ácidos.

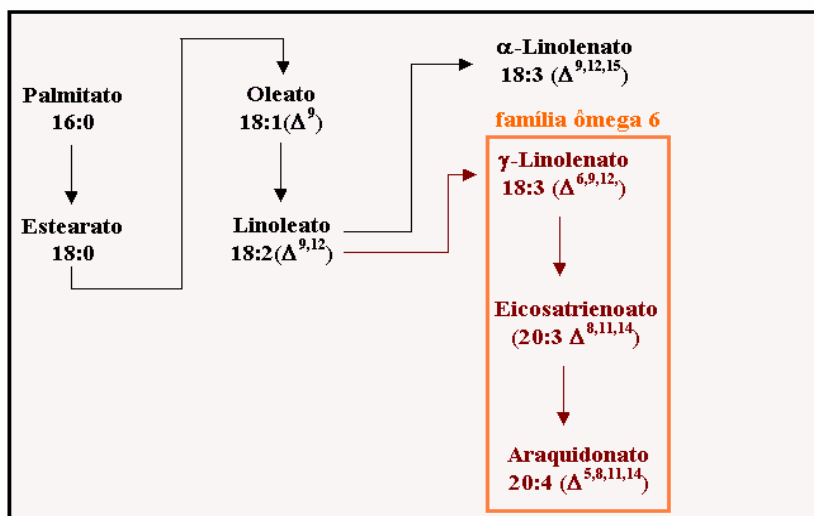


Figura 4. Esquema da síntese dos ácidos polinsaturados da família ômega 6.

Existem vários benefícios associados com os ácidos graxos polinsaturados e o consumo desses ácidos é altamente recomendado. Porém, os AGPs são significativamente vulneráveis aos processos degradativos que atingem todos os tipos de ácidos graxos insaturados, principalmente aqueles com maior número de insaturações. A degradação

diminui a vida útil, gerando produtos indesejáveis do ponto de vista nutricional (Osawa, 2005).

Degradação por oxidação é um fenômeno muito comum que ocorre entre os nutrientes que compõem os alimentos. Esse tipo de deterioração pode acontecer principalmente entre a fração lipídica, alterando diversas propriedades, como o valor nutricional, qualidade sensorial (sabor, aroma, textura e cor) e toxicidade (Kubow, 1993; Donnelly e Robinson, 1995). Essas reações são causadas pelo oxigênio atmosférico, peróxido, metais e outros agentes oxidantes. Os peróxidos são os primeiros produtos formados na oxidação e seus intermediários são os radicais livres. Por definição, radical livre é uma espécie química que apresenta número ímpar de elétrons livres, resultante de uma quebra homolítica de ligação química. Esta espécie é altamente reativa, pode se formar por calor, luz e radiação. Ao se formar em um meio que contenha ácidos graxos, os radicais atacam principalmente o carbono alfa, vizinho ao carbono da dupla-ligação dos insaturados, liberando o hidrogênio e um radical alílico do ácido graxo, que reage com o oxigênio para formar um radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$). Esse radical funciona como propagador da reação radicalar quando remove o hidrogênio alfa de outro ácido insaturado, e o resultado é um hidroperóxido (ROOH) e outro radical. O produto da degradação dos hidroperóxidos forma aldeídos, álcoois e ácidos de cadeia menor, que constituem o ranço, daí o nome rancidez oxidativa (Bobbio e Bobbio, 2001).

Uma perda expressiva pode ser causada no conteúdo dos ácidos graxos polinsaturados com a rancidez. Em tecidos de animais ela acontece rapidamente com o pós-morte, necessitando o emprego de técnicas como o uso de anti-oxidantes (carotenóides, ácido cítrico, vitamina E e outros) (Halliwell, 1997; Simic e Javanovic, 1994).

Outra maneira de inibir a oxidação lipídica é evitar condições que favoreçam a degradação como a temperatura alta, incidência de luz, abundância de oxigênio e umidade. Para isso pode ser empregado o processo de liofilização ou crioconservação, que consiste em retirar a água do tecido ou alimento, usando temperatura e pressão tais que a água sublima, sem afetar o conteúdo lipídico, que permanece congelado e sob vácuo. O processo de liofilização evita a oxidação lipídica porque, no caso de tecidos vivos pós-morte, é realizado com material previamente congelado, no qual existe pouco oxigênio em função

da pressão e isso impede a ação das enzimas e outros fatores que afetam a estabilidade dos ácidos graxos polinsaturados (Evangelista, 1998).

2.6.1. Família ômega-3

Os ácidos pertencentes a essa família possuem sua última insaturação no terceiro carbono, contados do grupo metila terminal, e são sintetizados a partir do ácido α -linolênico (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$), seu bioprecursor, também desta família. Tal ácido fornece como metabólitos os ácidos de maior importância desta série que são os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA).

Esses ácidos fazem parte da estrutura dos fosfolípidios que integram as membranas e a matriz estrutural de todas as células, influenciam várias funções nas membranas como ligações de hormônios e atividades associadas com enzimas transportadoras (Wu *et al*, 1996). Também são encontrados no cérebro e na retina, contribuindo com o desenvolvimento da visão e funções neurais.

Muitas são as utilidades dos ácidos ômega 3 nas funções corporais, alguns autores como Carvalho *et al.* (2003) informam que a administração de ácidos graxos polinsaturados, principalmente os ômega 6 e 3, demonstram efeito benéfico contra processos inflamatórios e alérgicos, como eczema, asma e artrite reumatóide. Também relatam a importância do seu efeito para síndromes pré-menstrual, diabetes e funções imunológicas. Segundo Calder (2003), os ácidos ômega 3 têm apresentado resposta para pacientes que passaram por cirurgias, atuando no sistema de imunidade, contra processos inflamatórios.

Embora os efeitos causados pelo consumo de ômega 3 sejam benéficos, existem algumas restrições quanto à quantidade consumida. Steinhart e Biernoth (2001) informam que, no ano de 1992, a British Nutrition, no Reino Unido, recomendava doses de EPA e DHA em torno de 1.25 gramas no total, juntamente com 2 gramas de ácido linoléico. Existe portanto, uma relação entre ômega 3 e 6, que deve ser respeitada para que os benefícios sejam atingidos. Cada enfermidade necessita de diferentes porções desses ácidos, mas para as necessidades diárias a relação ômega 3/ômega 6 é 1:2 em gramas, recomendada em 2004

pela ANVISA (Lima *et al*, 2000; Kim *et al*, 2005). A relação entre as duas famílias de ômega (3 e 6) parece estar relacionada com a síntese dos eicosanóides. Eicosanóides são compostos com atividade biológica, derivados do ácido araquidônico, compreendem os compostos que incluem as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos. São hormônios que agem próximos às células onde foram sintetizados. Estão envolvidos nas funções reprodutivas, inflamações, febres e formação das plaquetas. Quando ácidos das duas famílias são ingeridos, eles competem pelas mesmas enzimas, e ocorre um desequilíbrio na produção dos eicosanóides. Caso haja doses excessivas de uma das famílias, a preferência das enzimas é pelos ômega 3, daí a razão das limitações na ingestão de grande quantidade desses ácidos (Champe *et al*, 2002).

Um dos motivos pelos quais os ácidos graxos ômega-3 são fisiologicamente singulares no combate a doenças cardíacas é a produção de tromboxano TXA₃, um fraco agente agregador plaquetário, e prostaglandina PGI₃, um forte anti-agregador. Estes eicosanóides derivam da bioconversão do ácido eicosapentanoico (EPA) e atua contra a ação de fortes agregadores de plaquetas como o tromboxano TXA₂, que é um dos metabólitos sintetizados a partir do ácido araquidônico, como mencionado no parágrafo acima. Podem atuar ainda inibindo a conversão deste ácido para tromboxano TXA₂, uma vez que, a biossíntese dos eicosanóides depende da disponibilidade das enzimas que agem sobre os ácidos das duas famílias ômega 3 e 6 (Mahan, 1998). Segue abaixo a figura com a biossíntese dos ésteres de ácidos ômega-3 e seus respectivos eicosanóides.

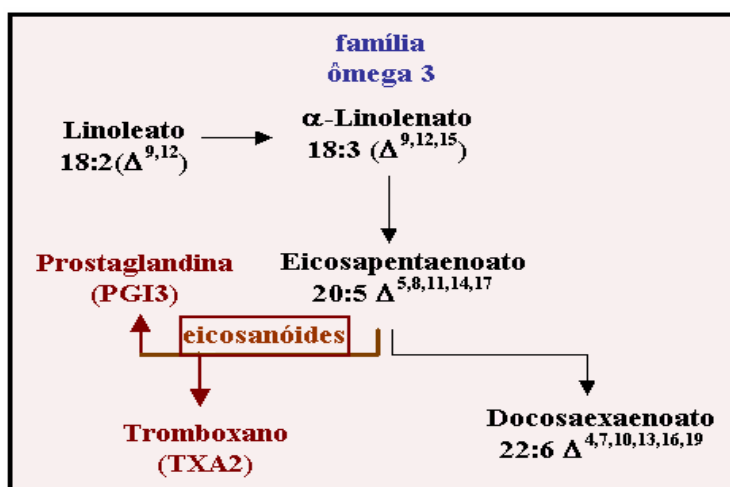


Figura 5. Biossíntese dos ésteres de ácidos ômega-3 e seus respectivos eicosanóides.

Existem inúmeras fontes de ácidos graxos ômega 3 na natureza, são encontrados em animais, vegetais e microrganismos. A fonte mais citada são os peixes, principalmente os de águas mais frias (Justi *et al.*, 2005 e referências). Alguns autores afirmam que quando há um decréscimo na temperatura ocorre um aumento no número de insaturações. O mecanismo para esse fenômeno pode estar relacionado com uma adaptação para manter constante o estado fluido das membranas, motivo pelo qual se afirma que a temperatura está intimamente ligada a mudanças nos percentuais dos polinsaturados em peixes marinhos. No entanto, as conclusões destes autores não permitiram encontrar relações entre a redução da temperatura e o aumento dos ácidos ômega-3, quando os mesmos trabalharam com alevinos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos a controles de temperatura de 23 até 32 °C.

O fato dos óleos de peixe, moluscos e algas conterem uma grande quantidade de ômega 3, deriva desta conversão por alongamento e dessaturação da cadeia, uma vez que organismos como o do peixe possuem a propriedade de interconversão entre as famílias ômega.

2.7. Bivalves como fonte de ômega-3

Ácidos da família ômega-3 são muito comuns em organismos marinhos, não só em peixes de águas profundas, mas também são integrantes de outros organismos que necessitam deles para alguns processos metabólicos. Eles podem ser encontrados em maior ou menor quantidade, dependendo do estado físico, fase reprodutiva ou de outros fatores individuais de cada espécie. Por isso existe a necessidade de observar as características morfológicas e fisiológicas dos animais em estudo para determinar quais as possíveis mudanças em seu ciclo de vida que alteram a composição dos ácidos graxos. Não é uma tarefa fácil, principalmente em animais migrantes como algumas espécies de peixes. Por outro lado, os bivalves apresentam-se como animais de vida sedentária, muitos deles vivem presos à superfície ou são de vida livre, possuindo a capacidade de nadar, porém este

recurso é utilizado mais para livrar-se de predadores (Ruppert, 1996). Caso se queira estudar as mudanças biológicas dos ácidos devido à sazonalidade ou outros fatores, os bivalves parecem ser uma boa opção, já que sua vida sedentária pode ser monitorada nos ambientes onde costumam se desenvolver.

2.7.1. Classe bivalvia

A classe bivalvia é também conhecida pelos nomes de Pelecypoda ou Lamellibranchia, composta por animais que apresentam uma concha com duas valvas em formatos ovalóides. Possuem brânquias de grande proporção, que tem as funções de coleta de alimento e troca gasosa. No geral, brânquias são órgãos respiratórios semelhantes aos pulmões, mas com o lado onde ocorrem as trocas gasosas voltado para o exterior. As brânquias dos bivalves funcionam também como uma peneira para partículas que ficam suspensas na água. Desta forma, sua função está mais ligada à alimentação do que propriamente a trocas gasosas.

Acredita-se que os bivalves modernos tenham evoluído de uma classe de moluscos ancestrais extintos, chamado rostrocônquio. Inicialmente eles eram escavadores rasos, pré-adaptados para filtração de alimentos e pertenciam ao grupo dos protobrânquios (apenas um par de brânquias) que encontram-se representados por algumas espécies hoje, mas seus fósseis remontam dos períodos Ordoviciano ou talvez Cambriano da era Paleozóica (570 a 280 milhões de anos atrás). Sua evolução deu origem aos lamelibrânquios, bivalves bem adaptados à filtração, que possuem brânquias dobradas em forma de “U”, com maior tamanho, possibilitando que esses animais consigam alimento mais facilmente. A evolução da filtração possibilitou que os lamelibrânquios dominassem a fauna dos bivalves desde então, colonizando outros *habitats* que eram inabitáveis aos seus ancestrais protobrânquios. Atualmente os lamelibrânquios abrangem animais tão comuns como os mexilhões e as ostras (Nielsen, 2002) (Ruppert, 1996).

2.7.2. Mexilhões

O mexilhão é o nome empregado para designar diversas espécies de bivalves pertencentes à família Mytilidea. Dentro dessa família podem ser encontradas diversas espécies de indivíduos propícios ao consumo humano, dois dos mais comuns são os do gênero *mytilus* (*mytilus edulis*) e *perna* (*perna perna*). Esse primeiro é encontrado no litoral do Rio Grande do Sul e em muitos outros lugares do mundo.

O mexilhão da espécie *perna perna* encontra-se distribuído pela costa atlântica da América do Sul, em uma faixa que se estende da Venezuela até o Uruguai, são muito abundantes entre o Rio de Janeiro e Santa Catarina, onde são encontrados em grande número nos costões rochosos. Este animal é tipicamente de *habitats* onde possam prender-se a substratos duros como rochas, madeira de cais e estacarias. A habilidade de escalar os substratos se deve a presença de uma série de cordas produzidas pela glândula bissal, que é capaz de secretar uma proteína que endurece após alguns minutos de formação (Figura 6).

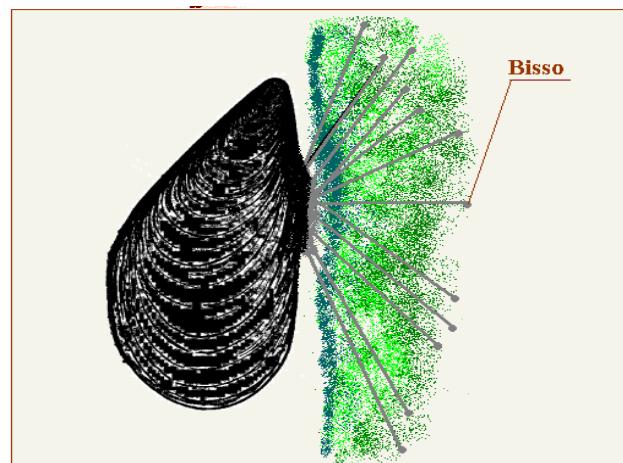


Figura 6- Representação da forma de fixação do mexilhão através do bisso.

Essa espécie é considerada como o maior mitilídeo brasileiro, podendo atingir 140 mm de comprimento nas valvas. São dióicos (dois sexos separados), não apresentam dimorfismo sexual externo, ou seja, é necessário abrir as valvas para classificá-los como

macho ou fêmea (Henriques e referências, 2004). Uma vez aberta às valvas, é possível identificar o sexo dos indivíduos pela coloração de um grande tecido que se acomoda no interior da valva, denominado de manto. Para o caso das fêmeas o manto é de coloração avermelhada. O ciclo sexual dos mexilhões *perna perna* apresenta-se em dois estágios iniciais de desenvolvimento das gônadas (células que produzem gametas) e um terceiro de maturidade sexual. O ultimo estágio é dividido em três sub-estágios nomeados como IIIA, IIIB e IIIC. No primeiro sub-estágio (IIIA) se encontra um manto bastante espesso e repleto de gametas (Magalhães e referências, 1998). Este é o sub-estágio que foi estudado no presente trabalho.

Pode-se dizer que o cultivo de moluscos não é uma atividade recente. No Brasil as primeiras pesquisas sobre mitilicultura foram realizadas pela USP, e estenderam-se até Santa Catarina devido às pesquisas realizadas pela UFSC nos últimos vinte anos, que iniciaram com os primeiros trabalhos com ostras e mexilhões, pelos doutores Carlos Rogério Poli e Aimê Rachel Magenta Magalhães. Atualmente, segundo Tramonte *et al.* (2003), Santa Catarina é o maior produtor nacional de mexilhões e ostras, respondendo por 95% da produção brasileira de moluscos. Em Florianópolis os mexilhões são cultivados em alguns locais propícios da ilha de Santa Catarina como em Sambaqui e no Ribeirão da Ilha. O cultivo é realizado em espinheis, localizados próximos à costa. Cada espinhel contém um determinado conjunto de cordas verticais presas horizontalmente a uma grande corda principal, essa por sua vez flutua com o auxílio de bóias. Deste modo, as colônias de mexilhões ficam imersas durante todos os períodos de marés baixas ou altas. Em anexo pode ser encontrada uma representação dos espinhéis e os mapas para localização dos dois pontos de cultivo, citados acima (Curtius, *et al.*, 2003).

Bivalves como o *Perna-perna* são bioatratores de diversidade e considerados como um importante membro da cadeia alimentar, fornecendo alimento para aves, peixes e mamíferos marinhos. Tem sido utilizado em pesquisas de cunho ambiental, como biomarcador de poluição por metais ou microrganismos. Mas pouco tem se estudado sobre a composição de sua gordura, apenas no que diz respeito à quantidade total de lipídios (Tramonte *et al.*, 2003). Alguns trabalhos com o de Passi *et al.* (2002) e Medeiros (2001) informam sobre a quantidade de ômega-3 e os demais ácidos que integram o perfil lipídico dos mexilhões. Porém, não há informações suficientes na literatura para se concluir que o

óleo de mexilhão está sendo empregado em escala industrial para a obtenção de ácidos graxos ômega-3, no Brasil. Pesquisas com ácidos graxos de mexilhão da espécie *perna perna* são raras, normalmente se encontra algumas referências com outras espécies de mitilídeo como o *Mytilus edulis* e também algumas espécies de ostras.

2.8. Análise de ácidos graxos de lipídios

São muitos os métodos para se avaliar lipídios e seus ácidos graxos constituintes. Uma variante nesses procedimentos é a forma de extração e preparo das amostras que serão analisadas. No geral, um tipo básico de extração pode ser usado para a obtenção dos lipídios totais de vários tipos de materiais sólidos como sementes trituradas, tecidos secos e até ossos. Para materiais líquidos a extração difere um pouco, mas normalmente segue o mesmo princípio das amostras sólidas. As metodologias mais utilizadas para amostras contendo gorduras são as gravimétricas, na qual uma mistura de solventes orgânicos é usada para extrair os lipídios totais, sendo evaporado em seguida, deixando apenas a matéria gordurosa que é pesada e armazenada. O método de Soxhlet é o mais conhecido entre os métodos de extração, não apenas para retirar lipídios, mas todos os compostos que possam ser arrastados pelo solvente extrator (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985). Inegavelmente esse método é eficiente para gorduras, porém seu longo período de aquecimento (4 a 8 horas) torna-o um método lento para um número grande de amostras que são analisadas todos os dias em laboratórios. Outros métodos mais rápidos são empregados hoje, a maioria deles utiliza uma mistura de solventes.

Os ácidos graxos livres são obtidos após a extração dos lipídios totais por uma reação de saponificação direta dos extratos. Emprega-se um procedimento padrão com hidróxido de sódio ou potássio em meio alcoólico. São raros os casos em que outros saponificantes são utilizados, principalmente porque os métodos como AOAC (1995) sugerem estes reagentes.

Os ácidos livres podem ser analisados diretamente por algumas técnicas, ou modificados para atender os quesitos de sensibilidade de alguns aparelhos empregados em análises, como o cromatógrafo gasoso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

3.1.1. Apresentação das amostras

As amostras consistem em mexilhões, cujas características principais estão listadas na Tabela abaixo.

Tabela 5- Características dos mexilhões tomados como amostra

Nomes populares	Características
Marisco ou mexilhão	<ul style="list-style-type: none"> - Classe BIVALVIA (LINNÉ, 1758) - Ordem MYTILOIDA (FÉRUSSAC, 1822) - Família MYTILIDAE (RAFINESQUE, 1815) - Gênero <i>perna</i> - Espécie <i>perna perna</i> (LINNÉ, 1758) - Cultivo: espinheis de cordas - Local de cultivo: Sambaqui, Florianópolis-SC - Outras : ver Introdução

Dados retirados de (Magalhães, 1998 e referências citadas)

3.1.2 Aquisição das amostras

As aquisições seguiram um padrão, tanto no período de coleta como no perfil dos indivíduos coletados. Tentou-se manter um período de coleta em intervalos de dois meses, conforme a disponibilidade de material e condições climáticas favoráveis.

As aquisições foram realizadas em 4 etapas, todas no período da manhã e no mesmo local, de acordo com o que segue (Tabela 6):

Tabela 6- Períodos e dados das coletas de mexilhões tomados como amostras

Data e hora	Etapas	Local
23/11/05- 09:30h	Primeira coleta	Sambaqui
08/02/06- 09:00h	Segunda coleta	Sambaqui
05/04/06- 10:00h	Terceira coleta	Sambaqui
08/06/06- 09:30h	Quarta coleta	Sambaqui

3.1.3. Coleta

Inicialmente as coletas dos mexilhões ocorreram em dias de mar calmo. Os pontos de coleta localizavam-se próximos à costa, porém foi necessário o uso de uma pequena embarcação para se ter acesso aos espinheis, onde se encontravam as cordas com os mexilhões. Aleatoriamente, escolheram-se de 3 a 4 cordas, com animais de tamanho adequado; as cordas possuíam uma grande quantidade de indivíduos, aglomerados em 1 ou 2 pontos bem definidos. Retornando para a praia, as cordas foram lavadas com auxílio de um jato de água; as incrustações de cada animal foram retiradas com um cutelo, após os mesmos serem separados das cordas, quando então, o bisso, que fixa o animal na corda, foi arrancado manualmente. Os mexilhões foram separados por tamanho, sendo que os menores (5 cm aproximadamente) eram guardados para produção de sementes. Entre animais de vários tamanhos, adotou-se um padrão entre 8 e 10 cm, para os animais selecionados. Usaram-se luvas, avental e botas de borracha para a realização desse trabalho.

No total foram coletados 24 animais (mais um extra em cada coleta) de acordo com as etapas mencionadas no item 3.1.2.; todas foram classificadas pela Profa. Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães (co-orientadora deste trabalho), e se encontravam no estágio IIIA de seu ciclo reprodutivo (estágio cheio). Para tal seleção, foram separados entre 20 e 30 animais de tamanhos apropriados. Todos receberam uma limpeza prévia em suas valvas, com escova e água corrente, disponível no local. O restante do bisso foi retirado com uma tesoura; para a abertura das valvas se fez necessário o corte do músculo adutor com uma

faca não serrilhada. A água inter-valvar foi retirada sobre corrente de água em abundância. Realizou-se a classificação dos animais por sexo e ciclo reprodutivo; somente 6 fêmeas no estágio IIIA foram classificadas, no restante encontravam-se machos e animais parasitados que, em ambos os casos, não serviam aos padrões deste trabalho.

A necessidade de padronização das amostras decorre das diferentes condições que os mexilhões podem ser encontrados em cultivo. Entre os animais coletados e separados, que possuíam tamanhos adequados, encontravam-se machos e fêmeas em seus diferentes estágios reprodutivos. Ressalta-se que também são encontrados animais parasitados de ambos os sexos. A identificação só é possível se o animal estiver com suas valvas abertas, o que significa que vários animais têm que ser abertos para a identificação de suas condições. Por isso adotou-se uma quantidade mínima de animais, mas todos eles com a maior quantidade de fatores padronizáveis possíveis (tamanho, sexo, ciclo reprodutivo, local geográfico e etc.). Nesse trabalho foi adotado a quantidade de seis animais para representar uma leva de indivíduos que se encontram em determinadas condições de temperatura e ambiente, não só para identificar as diferenças entre cada leva, mas para observar a variação do perfil dos ácidos graxos como um todo, ou seja, a suas amplitudes no total das levadas. Esse último, se deve ao fato da ocorrência de variação significativa no perfil dos ácidos graxos, sendo esta, esperada, devido ao próprio metabolismo do ser individual, como pode ser observado em Maia e Amaya (1993) e Hansel (2000).

3.1.4. Separação tecido-valva

O passo seguinte foi a retirada de toda a parte mole do animal, através da raspagem da parte interna das valvas, com uma espátula, sendo todo o material (tecido) removido, incluindo a musculatura interna. As valvas foram separadas em recipientes plásticos numerados.

As partes moles do mexilhão foram armazenadas em potes especiais para conservação de alimentos, também numerados em combinação com as suas respectivas valvas. Todos os recipientes continham tampas e permaneceram totalmente fechados, sem possibilidade de contato entre as amostras; em nenhum momento o material de manuseio

foi misturado, tudo permaneceu sem possibilitar troca de fluidos entre os animais. Os materiais de manuseio foram lavados e secados constantemente, durante a separação do tecido.

Posteriormente os recipientes contendo todas as amostras foram acondicionados em uma caixa de isopor contendo gelo, na qual permaneceram por aproximadamente uma hora durante o transporte do local de coleta (Sambaqui) até o laboratório (Trindade). Prosseguiu-se então para a etapa de processamento das amostras.

3.1.5. Processamento prévio das amostras pós-coleta

Imediatamente após a chegada no laboratório as partes moles das amostras foram submetidas aos procedimentos abaixo:

1. Os recipientes foram retirados do isopor e colocados no congelador; eram retirados conforme requisitados para o passo seguinte. Devido ao gelo estar em sacos plásticos fechados, o interior do isopor se encontrava seco assim como os recipientes que nele permaneciam armazenados.
2. Uma a uma, as partes moles foram retiradas de seus respectivos recipientes e colocados em um gral (limpo com água destilada, etanol PA e seco em estufa a 100 °C).
3. Nitrogênio líquido teve que ser adicionado diretamente em cima das amostras para facilitar o seccionamento dos tecidos moles, que procedeu com uma espátula de aço. Após a separação das partes, nitrogênio foi adicionado novamente. Um pistilo foi usado para macerar as partes fragmentadas, que seguiram para um balão (previamente pesado), após serem recongelados com nitrogênio. Pesou-se o conjunto após 30 minutos de descongelamento. Repetiram-se todos os passos anteriores para as demais amostras.
4. Os balões foram tampados com papel alumínio e mantidos no congelador por 24 horas.
5. Após este período, os balões seguiram ao liofilizador, no qual permaneceram por 12 horas sob vácuo; retirou-se os balões, que voltaram para o congelador por

mais 12 horas. Mais uma vez, foram levados ao liofilizador, permanecendo por mais 12 horas.

6. O tempo de permanência no liofilizador foi suficiente para obter uma porção de material seco, que foram pesados e macerados, sendo então, armazenados em tubos de vidro lacrados; permaneceram ali até sua utilização no procedimento seguinte.
7. Para o caso das valvas cada par foi retirado de seus recipientes e deixados para secar a temperatura ambiente por 12 horas. Posteriormente foram pesados e medidos.

3.2. Materiais e equipamentos da extração

Os reagentes usados na extração e preparo das amostras de mexilhão estão listados na Tabela 7.

Tabela 7- Reagentes usados no procedimento de extração

Nome	Pureza	Fabricante
Trifluoreto de Boro	14% (em metanol)	Sigma
Hexano	95% (HPLC)	Mallinckrodt
Metanol	99,9% (HPLC)	Mallinckrodt
DCM	99,9% (HPLC)	Mallinckrodt
Clorofórmio	99,9% (ABSOLV)	Vetec Q. F. Ltda
HCl	37% (P.A)	Quimex
Cloreto de acetila	99%	Fluka
KCl	99,5%	Vetec Q. F. Ltda
KOH	85% - lentilhas	Vetec Q. F. Ltda
Na ₂ SO ₄	99% - anidro (P.A)	Vetec Q. F. Ltda
Tolueno	99,98% (ABSOLV)	Tedia

Os equipamentos de laboratório utilizados durante a extração do óleo foram : ultrassom (Unique), centrífuga (Fanem), vortex (Phoenix), rota-evaporador (Fisatom) e liofilizador (Heto).

3.3. Padrões de análise

Os padrões utilizados nas análises do óleo extraído estão listados na Tabela 8. Esses padrões foram escolhidos tendo em vista a bibliografia consultada (AOAC, 1995; Medeiros, 2001; Passi, 2002).

Tabela 8- Padrões usados na análise do óleo de mexilhão

Nome	Pureza	Fabricante
Estearato de metila	99%	Nacalai Tesque INC
AOCS- 007N (mix de ésteres)	99%	AccuStandard
Éster metílico do ácido <i>cis</i> - 5,8,11,14,17-Eicosapentaenóico	95%	Sigma
Éster metílico do ácido <i>cis</i> - 4,7,10,13,16,19- Docosahexaenóico	98%	Sigma
Éster metílico do ácido Linolênico	99%	Sigma
Ácido. <i>cis</i> -11-eicosanoico	99%	Sigma
<i>cis</i> -13-docosenoato de metila	97%	Fluka

O padrão AOCS-007N contém os ésteres: miristato, palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidato, eicosenoato, docosanoato, erucidato e tetracosanoato.

3.4. Equipamentos de análise

Abaixo segue uma lista dos equipamentos e acessórios para análise do óleo extraído dos mexilhões:

1. Cromatógrafo gasoso (CG): modelo GC-17A, marca SHIMADZU, com programa CLASS-GC10 versão 1.3; equipado com detector por ionização em chama (DIC).
2. Cromatógrafo gasoso (CG-EM): modelo TRACE GC ULTRA, marca THERMO-FINNIGAN, com programa XCALIBUR versão 1.4; equipado com detector de massas, modelo POLARIS-Q, do mesmo fabricante.
3. Injeção manual, com micro-seringa (volume de 1,8 μL).
4. Programação de temperatura (nº1): 100 °C; 8 °C min^{-1} até 250 °C; isoterma 20 minutos. Split 1:40 com gás de arraste (N_2) e fluxo na coluna em 1.31 mL min^{-1} .
5. Coluna: CBP20, SHIMADZU; 100% polietilenoglicol (25 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase estacionária).
6. Programação de temperatura (nº2): 100 °C, 8 °C min^{-1} até 300 °C; isoterma 20 minutos. Split 1:50 com gás de arraste (He) e fluxo na coluna em 1.4 mL/minuto .
7. Coluna: RTX-5MS, 5%-difenil, 95%-dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase estacionária).

3.5. Limpeza da vidraria

Todos os vidros de material não aferido ficaram imersos durante 30 minutos em uma solução a 25% de detergente neutro em água fervida. Cada vidro recebeu uma lavagem com solução hidroalcoólica (100 g de KOH por litro de solução etanol/água destilada (9:1) (v/v)). Seguiu-se um enxágüe com água corrente e água destilada. A secagem foi realizada em estufa à 100 °C; e depois calcinado a 400 °C em uma mufla.

A vidraria aferida ficou imersa 24 horas em solução de detergente neutro; posteriormente recebeu 2 lavagens com a solução hidroalcoólica citada acima. Lavou-se com água corrente e água destilada; após secagem, em temperatura ambiente, realizaram-se três lavagens com acetona e diclorometano, antes da sua utilização (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985).

3.6. Preparo e extração das amostras para análise

O preparo e extração das amostras a partir do material liofilizado ocorreu em três etapas; seis amostras de cada coleta, em duplicata, foram usadas para extração do óleo. Manipulou-se seis amostras de cada vez em cada etapas da extração.

Em paralelo, um padrão de controle (controle 1), contendo apenas 1,225 mg do ácido *cis*-11-eicosanóico teve que ser usado para estimar o rendimento das etapas; este padrão percorreu o mesmo caminho das amostras, como segue nos itens abaixo.

Também foi utilizado uma mistura (mistura 1) dos padrões 5-colestan-3 β -ol e ácido *cis*-11-eicosanoico como controle do processo de separação dos compostos denominados neutros; para cada conjunto de seis amostras manipuladas, uma amostra desse padrão seguiu o mesmo procedimento.

3.6.1. Extração dos lipídios totais (Etapa 1)

Pesou-se aproximadamente 200 mg do liofilizado, respeitando as normas da metodologia padrão AOAC (1995), baseado no percentual de gorduras totais já estudado (Magalhães, 1998). As amostras foram transferidas para um tubo de ensaio com tampa, sendo adicionados 4 mL da mistura dos solventes metanol/clorofórmio (1:2) (Folch, 1956). Os tubos foram agitados no vortex por dois minutos, sendo então colocados no ultrassom onde permaneceram por vinte minutos, para a extração dos lipídios totais. Após os vinte minutos, os tubos foram centrifugados e o líquido passado para outros tubos de ensaio limpos e secos; efetuou-se este procedimento com mais 4 mL e outras duas vezes, com 2 mL, para garantir a extração dos lipídios. As quatro porções contendo os lipídios foram secas em um rota-evaporador, adaptado para evaporar o solvente no próprio tubo de ensaio, com banho controlado na temperatura de 50-60 °C . Um fluxo corrente de nitrogênio gasoso foi aplicado aos tubos que continham o extrato e os mesmos foram fechados e lacrados com filme (Dannenberger *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2006). Permaneceram no congelador (– 10°C) até serem requeridos na etapa seguinte.

O mesmo procedimento empregado para as amostras também foi realizado para os padrões de controle; os padrões referidos aqui são os denominados: “controle 1” e “mistura 1”, ambos mencionados em “3.6.”. Segue abaixo um fluxograma dessa etapa.

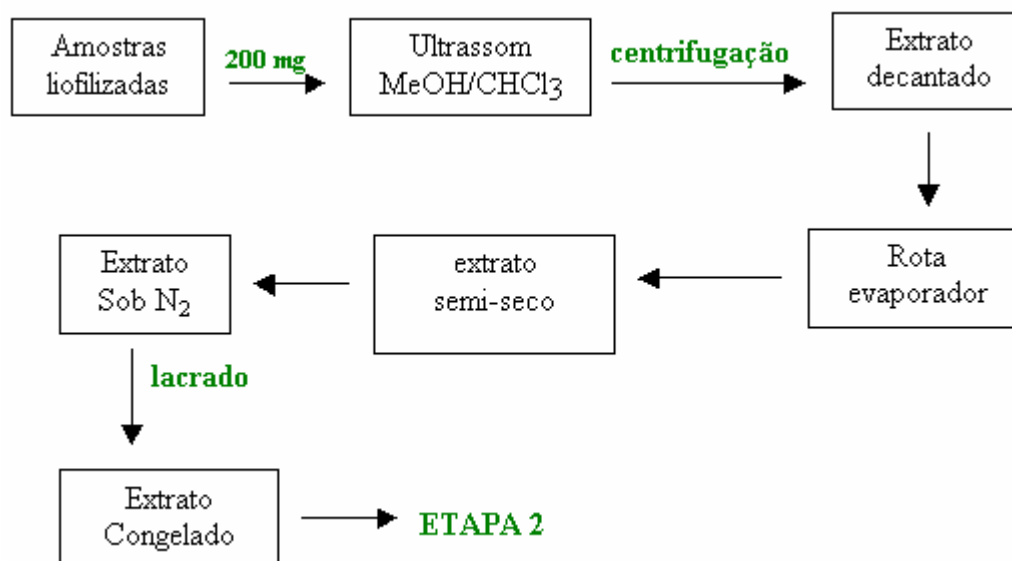


Figura 7. Etapa 1, fluxograma do procedimento de extração dos lipídios totais.

3.6.2. Saponificação e separação dos neutros (Etapa 2)

Uma reação de saponificação dos lipídios totais foi efetuada com 4 mL de solução KOH/MeOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) no tubo de ensaio contendo os extratos. Estes tubos permaneceram fechados em estufa por uma hora a 60°C . Ao extrato saponificado foi adicionado 4 mL de hexano para a separação dos compostos não saponificáveis, como os esteróis. Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes para total separação. As três porções de hexano, juntas, foram lavadas com 4 mL da mesma solução de hidróxido; separou-se a fase alcoólica, que retornou ao tubo contendo os extratos saponificados; foi utilizando uma centrífuga e uma pipeta Pasteur para separar e recolher essa fase aquosa. Recolheu-se 1 mL da fase hexânica para testes, essa fase recebeu uma etiqueta nomeada como “neutro”, e continha o nome e número da amostra da qual foi separada.

Para que os sais orgânicos passassem para a forma ácida, uma solução de HCl 2,0 mol L⁻¹ foi adicionada até pH 1. Seguiu-se uma adição de 4 mL de hexano para extrair os ácidos e separá-los da fase aquosa, que foi descartada depois de duas outras extrações com hexano. Os extratos foram separados em centrífuga (2 minutos) e coletados, passando para tubos de ensaio limpos e secos. O volume de hexano foi reduzido para aproximadamente 1 mL, em rota-evaporador, e seco completamente com nitrogênio gasoso. Os extratos secos foram separados em duas frações, de igual volume, através da adição de hexano (3x 1mL), que foi evaporado posteriormente com nitrogênio gasoso (Eder, 1995; ISO, 2002). Os tubos contendo os extratos separados receberam um lacre e uma etiqueta com o nome da amostra e o número da fração (1 e 2); seguiram para o congelador, onde permaneceram até serem requeridos na etapa seguinte. O processo de separação, em frações, não ocorreu para o padrão do ácido *cis*-11-eicosanoico (controle 1) e nem para a mistura de padrões (mistura 1) ; os mesmos permaneceram com suas massas originais.

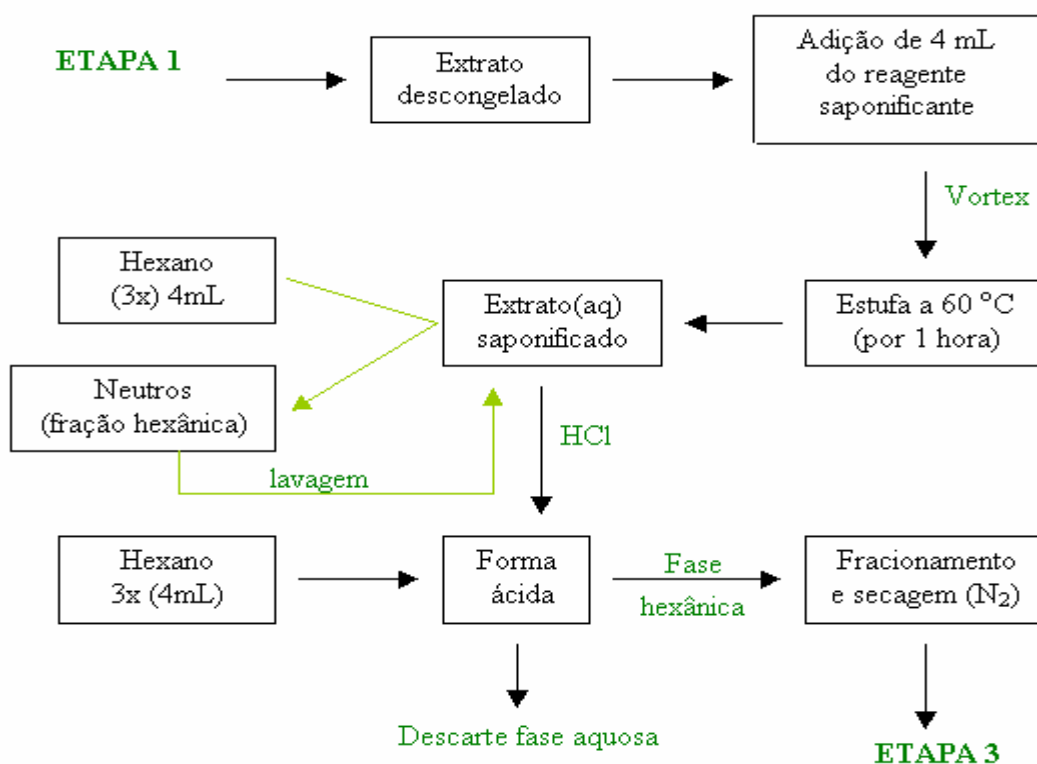


Figura 8. Etapa 2, fluxograma do procedimento de saponificação e separação dos neutros.

3.6.3. Preparação dos ésteres metílicos (Etapa 3)

A preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, separados em duas frações de mesma massa, seguiram por duas sub-etapas distintas. A fração de número “1” seguiu a sub-etapa “3.1”- com reagente BF_3 /metanol, e a fração de número “2” seguiu a sub-etapa “3.2”-com reagente cloreto de acetila/metanol. Somente as frações das amostras da primeira e segunda coleta passaram pelas duas sub-etapas. As frações das amostras pertencentes às duas últimas coletas seguiram apenas a sub-etapa “3.1”. Do mesmo modo, as replicatas de todas as amostras seguiram apenas a sub-etapa “3.1.”; nenhuma replicata passou pela esterificação com cloreto de acetila, embora tenham sido separadas em duas frações.

O padrão do ácido *cis*-11-eicosanóico (controle 1) foi esterificado somente com BF_3 /metanol; esse ácido percorreu todas as etapas desde a extração

Segue abaixo a descrição das sub-etapas de esterificação e seus respectivos fluxogramas.

a) Sub-etapa 3.1. Esterificação com reagente BF_3 em metanol

O preparo dos ésteres metílicos das frações, com o reagente BF_3 em metanol, procedeu de acordo com a metodologia padrão e as demais referências (AOAC, 1995; Kang *et al.*, 2005).

Inicialmente a concentração do reagente esterificante original foi alterada de 14 para 7% com a adição de metanol. Os tubos contendo os extratos secos receberam 2 mL do reagente esterificante; permaneceram fechados e em repouso durante uma hora na estufa a 60 °C. Depois de 5 minutos em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 2 mL de uma solução de NaCl 10% (p/v). Agitou-se os tubos durante 2 min, seguido por uma adição de 2 mL de DCM; os tubos foram agitados por mais 2 min e centrifugados por 3

min. Separaram-se as fases, tomando cuidado para pipetar apenas o DCM, que permanece em baixo da fase aquosa. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, e a fase contendo os ésteres seguiu para uma micro-coluna de sulfato de sódio anidro, sendo eluída com mais 6 mL de DCM. Evaporou-se o solvente em rota-evaporador, com banho de 50-60 °C, até um volume de aproximadamente 1 mL; esse solvente restante foi evaporado com nitrogênio gasoso. Novamente os tubos contendo os ésteres secos receberam etiquetas com identificação e lacre; permaneceram em congelador (-10 °C) até sua utilização.

Ao mesmo tempo, um padrão de controle (controle 2) contendo o ácido *cis*-11-eicosanóico seguiu todo o procedimento descrito “nessa” etapa. Uma quarta adição de 2 mL de DCM, foi aplicada apenas para o mesmo, sendo separada das outras três. É importante “não” confundir esse “controle 2” com o “controle 1”, esse ultimo passou por todas as etapas, enquanto o controle 2, foi introduzido apenas nessa etapa de esterificação, embora ambos sejam compostos pelo mesmo padrão.

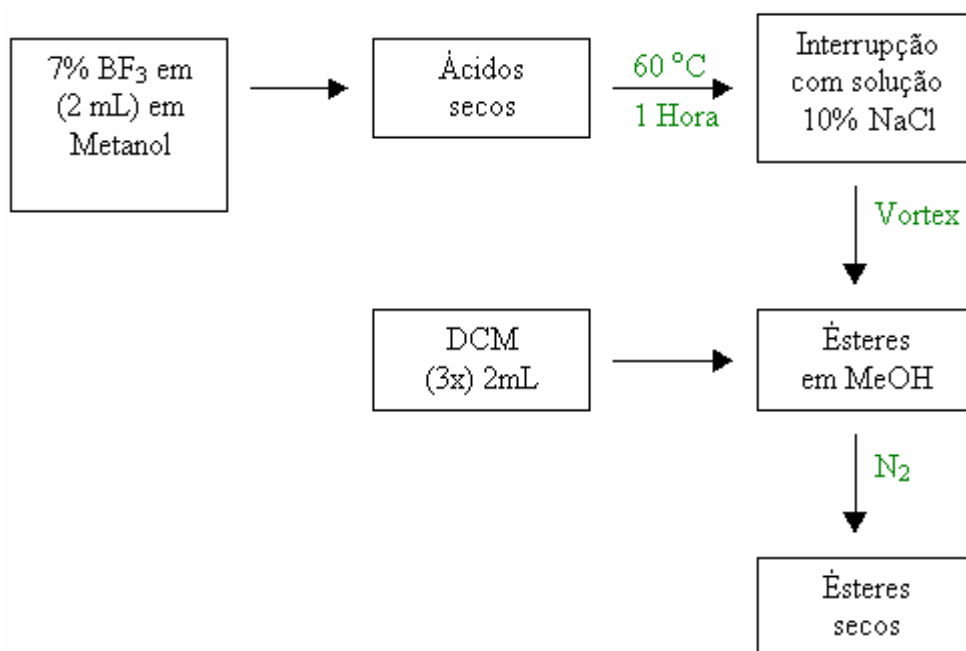


Figura 9. Sub-etapa 3.1., fluxograma do procedimento de esterificação com BF_3 / metanol.

b) Sub-etapa 3.2. Esterificação com reagente cloreto de acetila em metanol

A reação de esterificação para a fração '2' foi efetuada com 3 mL de solução cloreto de acetila em metanol gelado (1:10), adicionada no tubo contendo os ácidos juntamente com 1 mL de tolueno. Esta solução permaneceu em estufa durante cinco horas a 60 °C. Após cinco horas, os tubos contendo os ésteres receberam 2 mL de diclorometano e 1 mL de solução 10% de KCl (m/v); esta mistura foi centrifugada e separada, tomando-se a fase inferior e descartando-se a fase superior após outras duas extrações. Posteriormente o extrato foi submetido a uma coluna de sulfato de sódio anidro, e eluído com 10 mL de diclorometano; os eluatos, contendo os ésteres, foram recolhido em tubos e concentrados para 1 mL em rota-evaporador com banho de 50-60 °C, e levados a secar com fluxo de nitrogênio gasoso. Os tubos foram lacrados e etiquetados, permanecendo no congelador (- 10 °C) até sua utilização (Hansel, 2000; Palmquist, 2003).

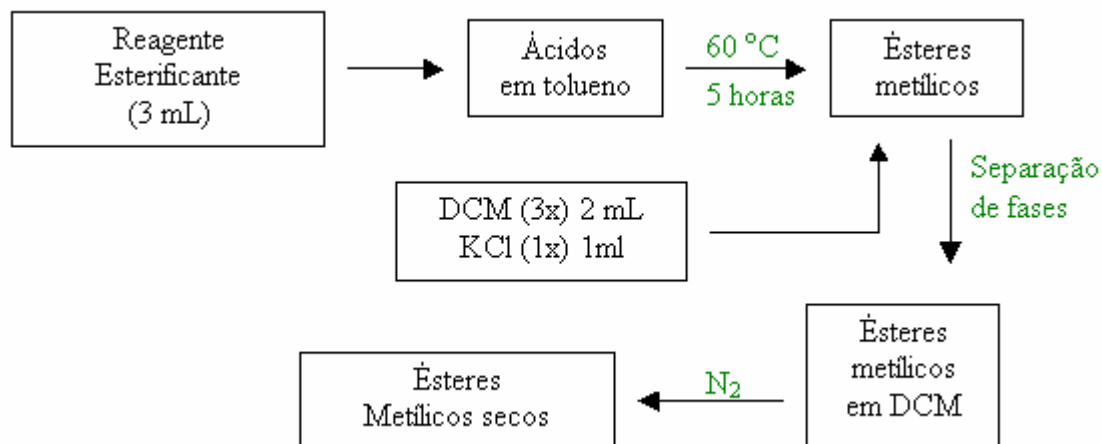


Figura 10. Sub-etapa 3.2, fluxograma do procedimento de esterificação com cloreto de acetila / metanol.

3.7. Testes prévios

Antes da aplicação dos procedimentos descritos nos itens anteriores (etapas 1 a 3), ocorreu uma simulação para a otimização da metodologia de extração, saponificação e esterificação; para tal, escolheu-se aleatoriamente três amostras liofilizadas da primeira coleta (indivíduos diferentes), que foram particionadas em três frações de mesma massa (200 mg). Os passos para os testes prévios seguem como descrito no item 3.8.; esse procedimento é referente apenas às três amostras teste e suas três frações.

3.8. Testes de fracionamento dos extratos

Realizou-se uma extração dos lipídios totais, como descrito na etapa 1, porém com algumas modificações à saber:

1. A extração dos lipídios totais foi realizada com três adições de 4 mL da mistura de solventes ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$, 1:2), sobre 200 mg de tecido liofilizado. Coletou-se os 4 mL da terceira, após a separação da parte sólida no ultrassom. Esse procedimento foi empregado para três amostras (uma de cada indivíduo). Todos os três extratos seguiram o restante da primeira Etapa (Etapa 1, como descrito no item 3.6.1.), eles receberam uma etiqueta com os nomes: amostra-teste 1,2 e 3, respectivamente.
2. Para outras três amostras (uma de cada indivíduo), repetiu-se o procedimento acima, porém, coletando a quarta adição da mistura de solventes ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$, 1:2), sobre 200 mg de tecido liofilizado. As três primeiras frações foram rejeitadas; as três coletas da quarta adição, seguiram o restante da primeira etapa (etapa 1), como descrito no item (3.6.1.).
3. Para as ultimas três amostras (uma de cada indivíduo), procedeu-se como descrito em 3.2.3.1.(2x 4mL +2x 2mL), porém uma quinta adição de 2 mL ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$, 1:2) foi realizada e coletada, seguindo o restante da etapa 1. As quatro primeiras frações foram combinadas, para cada amostra individualmente, recebendo os nomes de testes 1, 2 e 3.

4. Todas as porções mencionadas acima passaram pela Etapa 2 (item 3.6.2.), na qual “três alterações foram realizadas: 1) coletou-se uma quarta adição de 2 mL de hexano na retirada dos neutros (aplicado apenas para as três amostras denominadas de testes 1,2 e 3 (item acima); 2) coletou-se uma quarta adição, também de 4mL de hexano, na retirada dos ácidos, após a adição de HCl (aplicado apenas para as três amostras denominadas de testes 1,2 e 3 (item acima); 3) não houve separação de frações ao final da etapa 2, após os ácidos serem secos com nitrogênio gasoso.
5. Todas as porções seguiram para a Etapa 3 (item 3.6.3.); nessa etapa elas foram esterificadas apenas com o reagente BF_3 /metanol (sub-etapa 3.1.). Coletou-se uma quarta adição de 2 mL de DCM, na parte de separação dos ésteres, que se encontravam na fase metanólica (aplicado apenas para as três amostras denominadas de testes 1,2 e 3 (item acima).

Nota: As porções dos testes totalizaram 15 amostras, que permaneceram no congelador (-10°C) por uma semana, até suas respectivas análises no cromatógrafo a gás.

3.9. Injeções

Previamente, escolheu-se três amostras extraídas conforme descrito em 3.8. (item 1 dos testes) para empregar na otimização das condições de análise. Elas eram compostas pelas amostras denominadas de amostras-teste 1, 2 e 3. Foram injetadas utilizando as programações de temperaturas citadas pela metodologia AOAC (1995), que recomenda o uso de uma coluna carbowax 20MM, com programação de temperatura inicial de 170°C até temperatura final de 225°C , com rampa de 1°C min^{-1} . As mesmas amostras foram injetadas com a programação nº 1, citada em “3.4.” item 4. Em ambos os casos, o cromatógrafo (CG-17A) e a coluna (CBP20) utilizada, estão indicados em “3.4.” item 1 e 5.

As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas para 280°C e 300°C , e foram mantidas nesses valores. A cada 20 injeções eram trocados o *liner* e o septo. Todos os

liners usados eram para injeções com *split*, e foram lavados com uma mistura de solventes (acetona/etanol (1:1)) em ultrassom. Manipulou-se esses acessórios com pinça, evitando uma possível contaminação.

Foram realizados testes de pureza para os solventes hexano, clorofórmio, metanol e DCM; todos concentrados cinquenta vezes (em rota-evaporador) e injetados nas mesmas condições acima.

3.9.1. Injeções das porções extraídas nos testes

Todas as porções escolhidas para caracterizar os testes foram injetadas antes da montagem da metodologia apresentada em “3.6.”; essas porções incluem as amostras nomeadas como: amostra-teste (1,2 e 3) e teste (1,2 e 3). Também incluem as adições extras, realizadas na preparação dos testes descritos nos cinco itens de “3.3.”.

Injetou-se 1.8 μL de cada porção, anteriormente diluída com 400 μL de solução contendo o padrão interno cis-13-docosenoato de metila em hexano. A programação de temperatura (nº 1) e coluna (CBP20) utilizadas são dadas em “3.2.2.2.”, nos itens 4 e 5. Mais detalhes sobre os testes poderão se encontrados após a apresentação dos resultados.

3.9.2. Preparo e injeção dos padrões

Inicialmente, três padrões de ésteres metílicos e um padrão de mistura de ésteres foram preparados em cinco concentrações diferentes. Os três primeiros receberam uma quantidade de padrão interno (metil cis-13-docosenoato), cuja concentração final era sempre igual (320 mg.L^{-1}), para todas as cinco concentrações dos três padrões. A Tabela abaixo mostra as concentrações dos padrões preparados de acordo com as recomendações da metodologia (Ribani *et al.*, 2004).

Tabela 9- Concentrações das soluções padrão, em mg L⁻¹, preparadas a partir de soluções estoque

número	ML	EPA	DHA	MIX
1	677	1575	1715	5693
2	507	1350	1470	3795
3	338	1125	1225	2846
4	169	0900	0980	2277
5	085	0675	0735	1897

ML: linolenato de metila

EPA: éster metílico do ácido *cis*- 5,8,11,14,17- eicosapentaenóico

DHA: éster metílico do ácido *cis*- 4,7,10,13,16,19- docosahexaenóico

MIX: AOCS-007N

Injetou-se, em triplicata, todos os padrões mencionados acima, nas condições dadas em “3.4.”, no cromatógrafo gasoso (CG-17A) com programação de temperatura (nº 1) e coluna (CBP20) relacionados nos itens 1, 4 e 5, respectivamente. Da mesma forma, uma solução padrão de 5-colestan-3 β -ol (colesterol), com 300 mg.L⁻¹, também foi preparada e injetada. A coluna utilizada nesse último caso é diferente da empregada para os padrões de ésteres, com baixa polaridade (RTX-5MS). A programação de temperatura usada é a de “nº 2”.

Ao mesmo tempo, duas amostras de cada padrão de ésteres e mais uma de “5-colestan-3 β -ol (colesterol)”, foram injetadas no espectrômetro de massas (CG-EM), com programação de temperatura (nº 2) e coluna (RTX-5MS) dados nos itens 6 e 7 (ver 3.4.).

Tomou-se cuidados extremos com a limpeza da micro-seringa, usada nas injeções. A cada nova injeção a mesma era lavada 10 vezes hexano grau PA, e 20 vezes com hexano ultrapuro.

Todos os fluxos de saída, como o *split* e a purga do septo, foram conferidos antes das injeções e após as mesmas. Nesse caso, um bolhômetro era usado para as medidas.

3.9.3. Injeção das amostras

As amostras dos ésteres metílicos preparadas a partir do óleo de mexilhão, que se encontravam congeladas, foram retiradas do congelador e diluídas com uma solução contendo o padrão interno *cis*-13-docosenoato em hexano (320 mg L^{-1}). A diluição era realizada nas duas frações (1 e 2-esterificadas com os dois métodos) das amostras, e nas frações de número “1” das replicatas; as frações de número “2” de todas as replicatas permaneceram no congelador, e não foram injetadas à priori. Utilizou-se o cromatógrafo gasoso (GC-17A), com programação de temperatura (nº 1) e coluna (CBP20), dados nos itens 4 e 5 (ver 3.4.), para injetar todas as frações (1 e 2) das amostras e as frações (nº 1) de suas replicatas.

3.9.4. Injeção das amostras para identificação por espectro de massas

Escolheu-se seis amostras, alternando entre as frações derivatizadas com BF_3 e cloreto de acetila (frações 1 e 2 das amostras), para servirem como amostras de caracterização dos ésteres metílicos, por identificação pelo espectro de massas dessas amostras. Para este caso em particular, fez-se uso de uma coluna RTX-5MS, instalada CG-EM, com a programação de temperatura de “nº 2” (ver “3.4.”, itens 1, 2, 6 e 7).

As mesmas seis amostras foram injetadas no cromatógrafo gasoso (CG-17A) com as condições de programação de temperatura e coluna, aplicadas no CG-EM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Classificação de amostragem

De acordo com Magalhães (1998), um mexilhão parasitado por *Bucephalus*, que é o parasita encontrado nos animais rejeitados nesse trabalho, pode alterar a composição dos ácidos graxos, principalmente os de cadeia longa, que são de grande importância para as membranas dos bivalves. Segundo Medeiros (2001), pode ocorrer uma pequena variação na quantidade dos ácidos graxos, principalmente os ácidos EPA e DHA, para sexos diferentes. A fêmea aparentemente apresenta maior quantidade de ômega 3. As informações desses dois autores foram adotadas no critério de seleção dos mexilhões classificados no presente trabalho. Por este motivo os mexilhões parasitados e os machos foram rejeitados.

Quanto às medidas de comprimento, encontraram-se valores médios na ordem de $8,97 \pm 0,28$ e $4,38 \pm 0,10$ cm para comprimento e espessura das valvas, respectivamente. As valvas tinham massa de $29,2 \pm 1,4$ g, em média, o que corresponde a aproximadamente 62 % da massa total do animal. A massa úmida, dos tecidos moles, forneceu uma média de $17,6 \pm 0,8$ g, e quando liofilizada diminuiu seu valor para 21 % (em média), indicando uma umidade de aproximadamente 79 %, que está de acordo com a bibliografia consultada, na qual a umidade encontra-se na faixa de aproximadamente 72 a 85 % (Furlan, 2004).

Em relação às datas de coleta, foi adotado um critério que envolve oito meses, de novembro de 2005 até junho de 2006. Esses meses representam adequadamente a ascensão e queda de temperatura que ocorre de outubro a março e de abril a agosto, respectivamente. Essa tendência de variação de temperatura foi baseada nos anos anteriores a 2006. Para efeito de calculo, as médias de temperatura da água do mês anterior e do mês de coleta, foram usadas para criar uma nova média de temperatura, única para a coleta em questão, que representasse adequadamente a variação de temperatura sofrida pelos mexilhões. Os dados de temperatura são fornecidos pelo Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos de Santa Catarina (LCMM), que fornece os valores das médias baseadas em medidas

quinzenais, retiradas no local de coleta (Sambaqui). Os valores mencionados acima serão avaliados no decorrer dessa discussão.

4.2. Preparos pós-coleta

Após os trabalhos de campo, iniciaram-se os procedimentos de preparo das amostras. Nessa etapa, foram tomados cuidados com a degradação pós-morte, por isso, o material úmido foi manipulado com rapidez, pois a degradação da gordura ocorre relativamente mais rápido em presença de água, uma vez que as enzimas lipolíticas como Lipases e fosfolipases atuam em presença de água ou emulsão lipídeo-água. A rancidez hidrolítica poderia prejudicar a análise do material úmido, pois os ácidos não degradam de maneira uniforme, os polinsaturados são degradados mais rapidamente que os demais (Paques e Macedo, 2006).

Detectou-se um problema na fase de seccionamento da amostra úmida, antes do congelamento e liofilização; este foi identificado na primeira amostra teste, ou seja, a amostra extra, que era coletada junto com as seis amostras principais, sendo que esta amostra teste era previamente manipulada, para otimizar os procedimentos. O problema em questão foi resolvido com uma pequena quantidade de nitrogênio líquido, que foi adicionado diretamente sobre a amostra. Desta maneira os tecidos congelavam-se instantaneamente, possibilitando o corte de pequenos fragmentos de tecido congelado. Adicionou-se nitrogênio, durante a maceração, até que as partes moles do mexilhão ficassem maceradas por completo. Sem o uso de nitrogênio líquido não seria possível a maceração, pois o tecido não se romperia facilmente e a gordura formaria uma emulsão com a água presente em abundância nos tecidos, que não se liofilizariam.

Durante a liofilização, um recongelamento teve que ser realizado, para evitar que a amostra ficasse descongelada pelas 12 horas seguintes. Não foram necessários mais do que um recongelamento, pois o vácuo procedente do aparelho de liofilização evita o descongelamento da amostra por um grande período de tempo. Durante todo o processo de liofilização, os balões permaneceram envoltos em papel alumínio, para evitar tanto o aumento de temperatura interna do balão como uma possível fotodegradação, que embora

não ocorra facilmente nesta condição de vácuo, não deve ser descartada *a priori*, pois o processo de liofilização demorou aproximadamente 36 horas no total, somando-se o recongelamento (Araújo, 1999). Depois de liofilizado e lacrado, o tecido seco está protegido contra os processos oxidativos.

4.3. Padrões e equipamentos empregados

Os padrões dos ésteres metílicos analisados nesse trabalho foram selecionados após consultar as referências citas no item de materiais (3.3.). Inicialmente foram adquiridos os padrões de ésteres dos ácidos EPA, DHA e α -Linolênico (objetivos principais da discussão). O padrão AOCS-007N (mistura de ésteres) foi usado para auxiliar na identificação dos ácidos sob a forma de ésteres.

Quanto aos equipamentos utilizados para análise, pode-se dizer que foram utilizados conforme sua disponibilidade. A coluna polar CBP20 não pode ser acoplada no CG-EM por motivos técnicos; por consequência disso, uma coluna RTX-5MS teve que ser usada nesse equipamento para que fosse possível identificar os ácidos presentes nos padrões e nas amostras.

4.4. Procedimentos pré-análise

Antes da análise do óleo proveniente dos mexilhões, uma serie de procedimentos analíticos tiveram que ser empregados. Alguns deles serão discutidos neste item, e compreendem a parte de extração e preparo das amostras (3.6.).

Para a extração das amostras de óleo de mexilhão, utilizou-se uma porção do material liofilizado, pesado sempre em dobro, cuidando sempre para que a massa da amostra e sua duplicata fossem exatas.

Dentre os métodos de extração de gorduras, optou-se pelo de Folch (1951), que utiliza solventes e agitação para extrair a gordura de todas as classes de lipídeos no geral. Este método é muito usado, embora já tenha sofrido varias modificações durante os últimos

anos (ex: Christie, 1990). Segundo Pacheco (2005), ocorrem reações químicas de rancidez em óleos durante o armazenamento e processamento, como no caso do peixe, que contém grande quantidade de polinsaturados. Temperaturas altas aceleram estas reações, por isso os métodos como extração por soxhlet foram rejeitados.

O uso do ultrassom foi particularmente importante nesse trabalho, pois a permanência da amostra sobre forte vibração nesse aparelho garante uma extração mais efetiva da gordura. Após término do processo de extração dos lipídios totais, os extratos secos foram pesados e em média os valores extraídos correspondem a $0,055 \pm 0,009$ g. Tal valor informa que a massa desse extrato é 29 % do valor total de massa do tecido seco, utilizado na extração. Uma observação importante aqui é que este extrato total de lipídios não sofreu nenhuma purificação, está no estado bruto. Motivo pelo qual o valor percentual é alto e não deve ser confundido com o óleo puro, que aparece em algumas referências.

4.5. Injeções e dados com base nos testes prévios

Todos os procedimentos empregados nos itens “3.6.1. até 3.6.3.”, foram baseados nos resultados obtidos com os testes prévios comentados no item 3.7. As amostras oriundas desses testes tiveram que ser injetadas no cromatógrafo após otimização das condições de análise, que foram realizadas também com três amostras preparadas nos testes. O resultado das injeções mostrou que o tempo de corrida dado pela metodologia AOAC (1995) é demasiadamente grande para os ésteres metílicos, especificamente para o presente trabalho. A comparação dos valores estimados com os valores obtidos utilizando a programação de temperatura (nº 1) citada em “3.4.” revelou melhora na separação, provocada pela rampa de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ não é suficiente para separar completamente alguns ésteres por completo. Logo se preferiu a programação mais rápida, que não afeta a separação e economiza tempo de corrida. Após aperfeiçoar as condições, pôde-se obter as informações necessárias para otimizar o processo de extração; os resultados dos testes, após injeção dos mesmos, são dados abaixo:

1. Todo o solvente apresentou um grau de pureza suficiente para não provocar erros sistemáticos nas amostras, ou seja, não foram observados picos de contaminantes na região cujos tempos de retenção correspondem aos encontrados nas amostras.
2. As primeiras três amostras-testes (1,2 e 3) injetadas foram diluídas apenas com hexano. Uma posterior injeção com as mesmas amostras, secas com nitrogênio e rediluídas em hexano contendo o padrão *cis*-13-docosenoato de metila, provou que não havia pico na região de tempo de retenção onde aparece esse padrão, utilizado aqui como padrão interno. Logo, o padrão mencionado pode ser utilizado com segurança nas amostras. Fica claro então, que o referido padrão (identificado por P.I) respeita todos os quesitos inerentes ao citado pelas referências, quanto ao uso correto deste tipo de padrão (Alves e Moraes, online)
3. As amostras-testes, provenientes da terceira adição do solvente de extração (3.8. item 1), demonstraram que três adições desse solvente são insuficientes para extrair totalmente os lipídios do tecido, mesmo quando se utiliza o ultrassom; seus cromatogramas apresentavam picos de baixa intensidade na região de tempo de retenção dos ésteres. Porém, quando são feitas quatro extrações (3.8. item 2) nenhum pico quantificável é identificado nos cromatogramas, para as três amostras em questão; o mesmo pode ser dito para a quinta adição do solvente de extração (3.8. item 3). Portanto, foi adotado o uso de quatro extrações para as amostras principais.
4. O teste de separação dos neutros, demonstrado em 3.8. (item 4), provou que três adições de 2 mL de hexano é suficiente para separar os neutros dos saponificáveis; o cromatograma em questão apresentava apenas um pico, identificado como sendo o colesterol (5-colestan-3 β -ol). O mesmo aconteceu com a mistura de padrões identificada como “mistura 1” (3.6.), em que as três adições foram suficientes para separar totalmente o colesterol do outro padrão de ácido *cis*-11-eicosanóico.

5. Outro teste com resultados positivos foi o da extração dos ácidos após a adição de HCl (3.8., item 4). As três adições de hexano são suficientes para recuperar todos os ácidos presentes após a saponificação dos mesmos.
6. O teste da quarta adição de DCM, na fase de separação dos ésteres obtidos após a sub-etapa “3.1.” (esterificação), comprovou que três extrações com este solvente são suficientes para retirar todos os ésteres da fase metanólica na qual eles são preparados. Novamente, os cromatogramas dessa quarta adição de DCM não continham picos quantificáveis na região de tempo de retenção dos ésteres.
7. Da mesma maneira, o teste de branco não demonstrou qualquer contaminação capaz de interferir na análise das amostras. Não foram identificados picos nos cromatogramas do branco para a região de tempo de retenção dos ésteres. O branco é formado pelo solvente de extração (clorofórmio/metanol, 2:1) que percorreu todas as etapas empregadas para os demais testes dados em “3.8.”

4.6. Identificação por espectrometria de massas dos ésteres preparados

As seis amostras selecionadas para a identificação dos ésteres metílicos foram injetados manualmente no CG-EM, através de uma microseringa de 10 µL. O modo “full scan” de escaneamento foi preferido, pois não se conhecia o perfil de intensidade das massas (foi usado um analisador de massas do tipo armadilha de íons, *ion trap*). Ocorreram algumas dificuldades para a identificação dos ésteres devido ao perfil de intensidade relativa dos fragmentos ser diferente dos encontrados nas bibliotecas mais conhecidas (NIST e AMDS). Essas bibliotecas possuem banco de dados com espectros obtidos, na maioria dos casos, com o quadrupolo (Silverstein e Webster, 2000). Uma alternativa para minimizar esse problema foi o uso do padrão AOCS-007N, com o objetivo de identificar a maioria dos ésteres. A Figura 11 mostra dois cromatogramas de íons totais. O primeiro pertence a mistura de ésteres AOCS-007N e o segundo a uma das seis amostras, escolhida como exemplo. Na Figura 12 são apresentados os espectros de massas do pico 5.

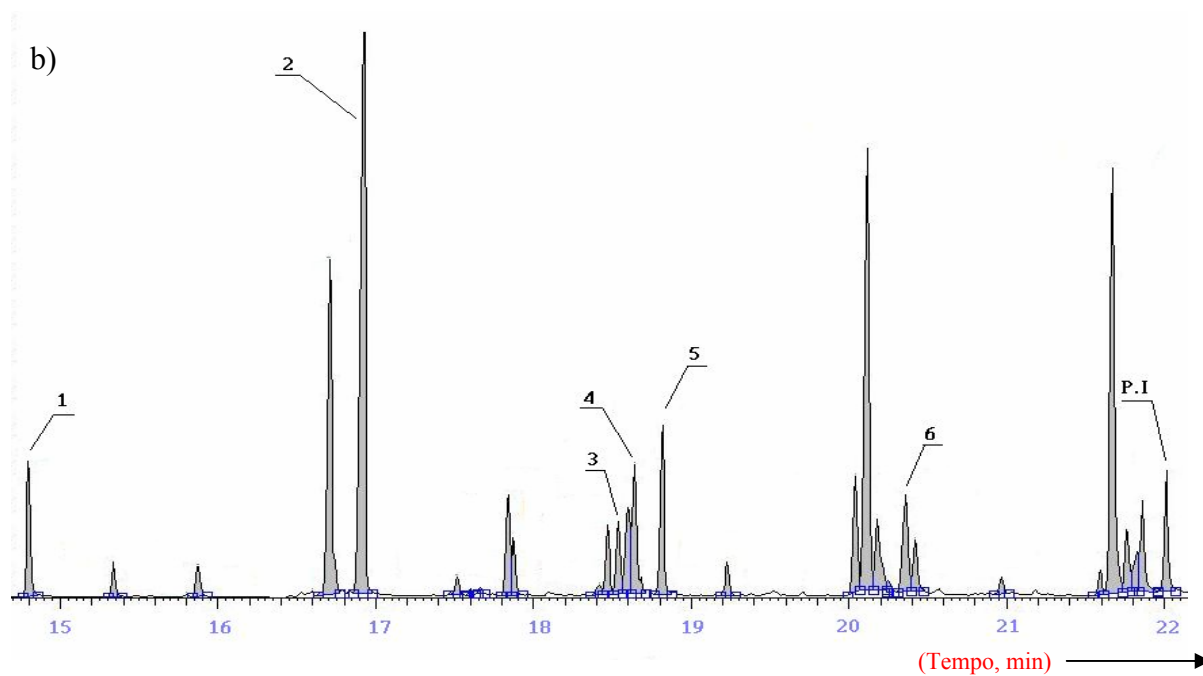
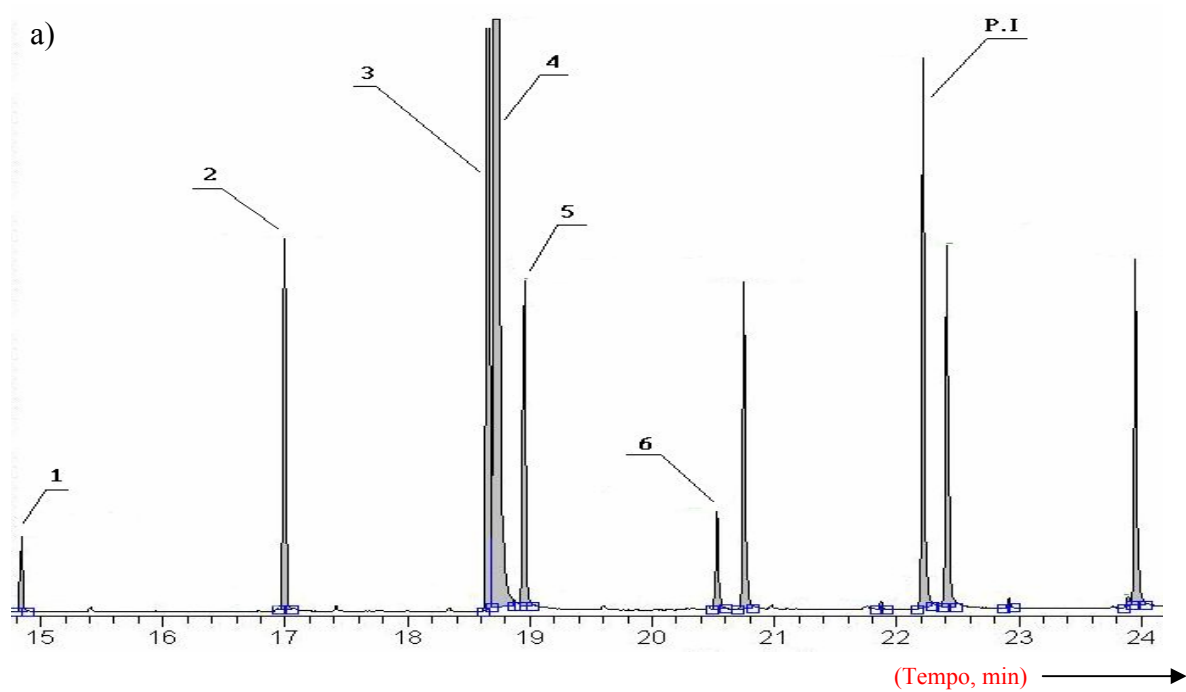


Figura 11. Cromatogramas de íons totais da mistura de ésteres do padrão certificado AOCS-007N (a) e de uma das amostras do extrato de mexilhão (b).

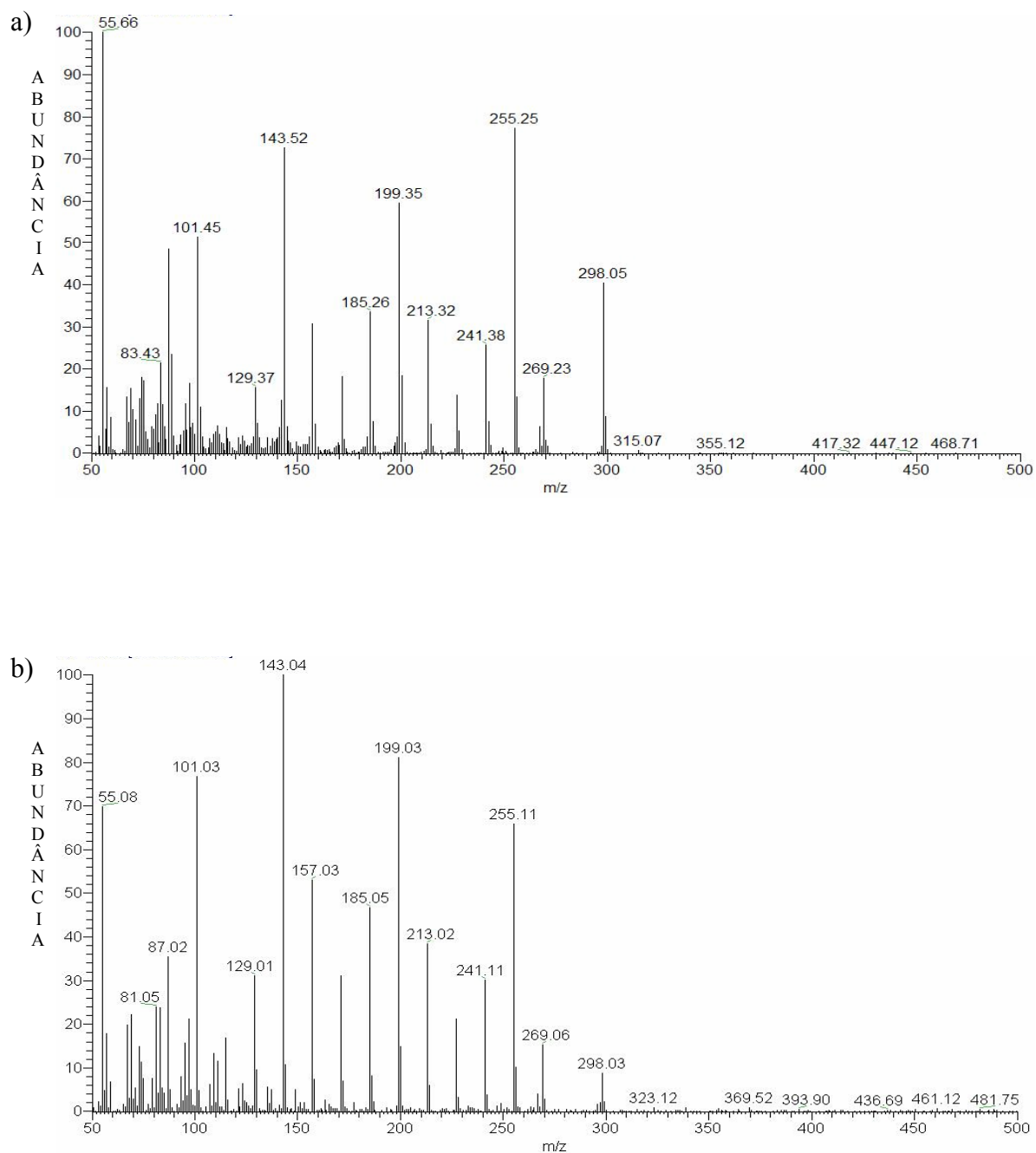
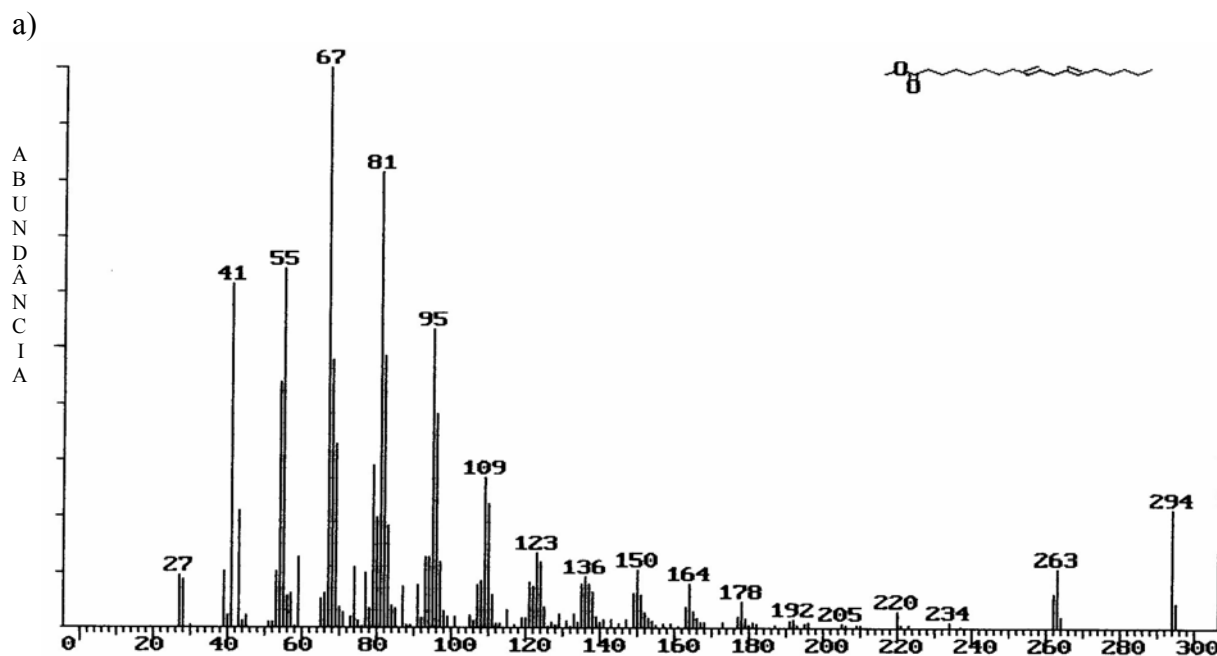


Figura 12. Espectros de massas do pico de número 5 (cromatograma da Figura 11) para o padrão AOCS-007N (a) e para amostra (b); âmbos pertence ao estearato de metila

Existe uma grande semelhança entre estes dois fragmentogramas relacionados acima. Pelo fato do analisador de massas desse aparelho ser do tipo que concentra os fragmentos mais pesados, pode-se notar a presença do íon molecular em m/z 298, pertence ao estearato de metila. O estearato é encontrado em quase todos os tipos de gordura e é quimicamente muito estável se comparado com os insaturados. Por isso é usado como padrão. É possível encontrar espectros do estearato em todas as bibliotecas disponíveis. Porém, no espectro obtido pelo modo *ion trap* nota-se a ausência do pico base m/z 74, que é característico de todos os ésteres metílicos saturados e corresponde ao rearranjo McLafferty (Kitson *et al.*, 1996). Outro ponto conflitante refere-se ao pico m/z 87, que também é característico de ésteres. Silverstein e Webster (2000) argumentam que esse pico é sempre mais intenso que seus homólogos formados por intervalos de massa de 14 unidades.

Apenas os ésteres saturados apresentaram esta diferença. Para os ácidos com insaturações, os espectros de massas apresentaram um perfil mais parecido com os encontrados nas bibliotecas. A Figura 13 exemplifica a semelhança entre os dados obtidos e a referência NIST, para o éster *cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato).



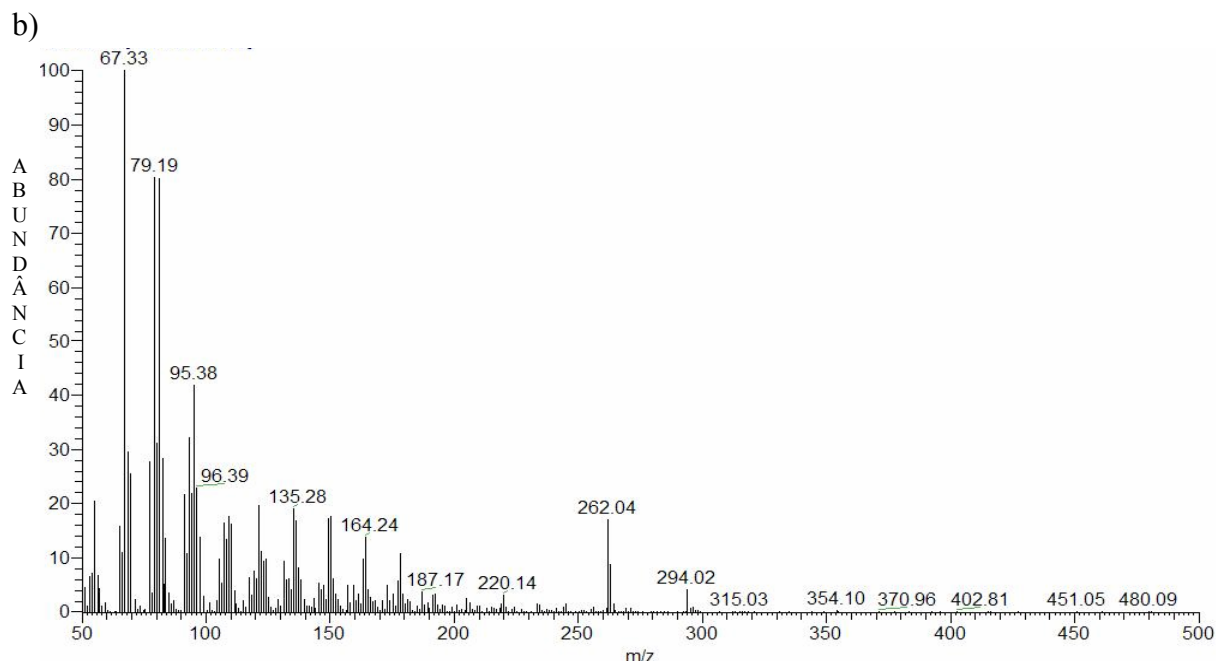


Figura 13. Espectros de massas do (a) éster *cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato), disponível na biblioteca NIST, e (b) o espectro obtido do extrato de uma das amostras de mexilhão.

Os ésteres “*cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoato de metila” e “*cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoato de metila”, foram identificadas com a injeção dos padrões dessas duas substâncias puras, contendo também o padrão interno “P.I”, para correção do tempo de retenção. Esse caso é semelhante ao apresentado para os insaturados e suas identificações não apresentaram maiores dificuldades. Na amostra da Figura “11b”, esses dois picos são respectivamente os de maior intensidade, que aparecem entre os tempos de retenção 20 e 22 minutos.

Uma anomalia acontece com o éster linolenato de metila. Embora o padrão AOCS-007N contenha este ácido, a coluna utilizada não foi capaz de separá-lo e seu pico foi encoberto pelo éster *cis*-9-octadecenoato de metila (oleato). Logo, esse éster não foi identificado por espectrometria de massas.

Apesar das diferenças citadas, foi possível identificar, com clareza, grande semelhança quanto aos espectros de massas dos picos numerados de 1 a 6 (Figura 11b). Todos os espectros possuem a maioria dos picos de massas iguais aos dados pela biblioteca, apenas com abundância relativa diferentes, no caso dos saturados.

Juntando-se todos os dados acima foi possível identificar, na amostra, os ésteres cujos nomes são dados na Tabela 10.

Tabela 10 - Ésteres identificados nas seis amostras analisadas por espectrometria de massas

n°	Rep. do ácido	Nomes dos ésteres metílicos
1	14:0	tetradecanoato (miristato)
2	15:0	pentadecanoato
3	16:1 (n 6)	cis-9-hexadecenoato (palmitoleato)
4	16:0	heptadecanoato (palmitato)
5	17:0	heptadecanoato (margarato)
6	18:2 (n 6)	cis-9,12-octadecadienoato (linoleato)
7	18:1 (n 9)	cis-9-octadecenoato (oleato)
8	18:1 (n 7)	cis-11-octadecenoato (vacenato)
9	18:0	octadecanoato (estearato)
10	20:5 (n 3)	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoato
11	20:1 (n 9)	cis-11-eicosenoato
12	22:6 (n 3)	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoato

4.7. Identificação e quantificação por cromatografia gasosa dos ésteres preparados

4.7.1. Identificação e resposta quantitativa

A análise por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama seguiu-se à identificação dos compostos por espectrometria de massas e testes prévios. Inicialmente

teve-se que comparar a sequência de eluição no CG-EM com a sequência obtida no CG-DIC. Foi testado primeiramente a mistura de padrões AOCS-007N, usada como referência para os tempos de retenção. Nesse caso, utilizou-se uma coluna apolar RTX-5MS, igual à coluna utilizada no CG-EM. A ordem de eluição foi semelhante, inclusive com tempos de retenção relativo ao P.I, pois as rampas de aquecimento empregadas em ambos os casos foram idênticas ($8\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Os resultados obtidos com essa comparação foram usados para checar as diferenças nas razões de área (éster/P.I) de cada componente dessa mistura em função do tipo de detector empregado, espectrômetro de massas (EM) ou ionização em chama (DIC). Houve uma diferença nas respostas de, no máximo, 10 % que não gera problemas para a identificação dos ésteres, pois a quantidade dos mesmos é diferente na mistura, não sendo confundida simplesmente por uma diferença de 10 % no valor da razão. Como os resultados dessa comparação são inerentes às diferenças de detector, e não de coluna, o passo seguinte foi a troca dessa coluna apolar pela coluna polar, que tem por finalidade separar os ésteres oriundos do óleo dos mexilhões.

O mesmo cálculo de razão entre áreas (éster/ P.I) realizado para a comparação de resposta dos detectores, também foi utilizado para comparar as duas colunas de polaridade diferente. Nenhuma diferença significativa foi encontrada aqui que pudesse influenciar negativamente na identificação dos ésteres injetados na coluna polar. É importante lembrar que está sendo comparada a mistura AOCS-007N injetada na coluna RTX-5MS (apolar) e CBP20 (polar), com a mesma rampa de $8\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, no mesmo cromatógrafo. Foi melhor a separação dos ésteres com a coluna polar CBP20, devido aos seguintes fatores:

1. Essa coluna é mais eficiente para separar os ésteres com massas que diferem de duas unidades como, por exemplo, os ésteres dos ácidos 18:1 e 18:2 (não foi observada a coeluição que ocorria entre eles na coluna apolar). Na figura 11a aparece a coeluição desses ésteres identificados pelos números 4 e 3, respectivamente.
2. Nessa coluna ocorre uma inversão na ordem de eluição, com aumento do tempo de retenção em função do aumento do grau de insaturação. Observou-se também uma melhora de 40 % no fator de separação (α) dos ésteres dos ácidos 18:1 (n 9) e 18:1 (n 7), calculados em relação a P.I.

3. O pico correspondente ao éster do ácido α -linolênico foi identificado, o que não era possível quando se usava a coluna apolar. É possível observar na figura 11a, que apenas dez compostos são separados pela coluna apolar enquanto que na coluna polar, aparecem onze compostos (Figura 14).

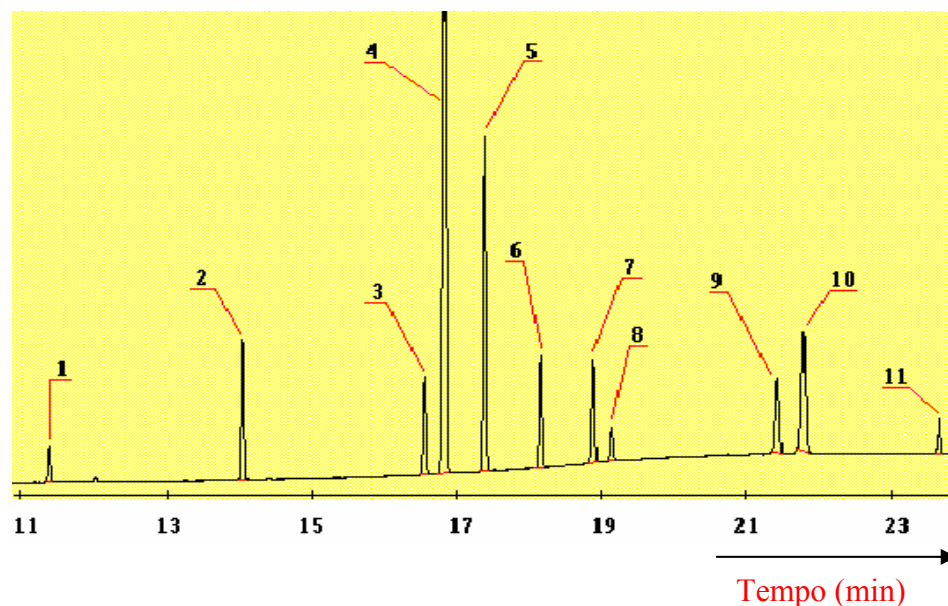


Figura 14. Cromatograma da mistura de padrões AOCS-007N, analisado com uma coluna polar CBP20. Os ácidos são: 1) 14:0; 2) 16:0; 3) 18:0; 4) 18:1 (n 9); 5) 18:2 (n 6); 6) 18:3 (n 3); 7) 20:0; 8) 20:1 (n 9); 9) 22:0; 10) 22:1 (n 9); 11) 24:0.

Após identificar a sequência, procedeu-se a injeção dos padrões conforme relatado em “3.9.2.”. As cinco concentrações dos padrões de ésteres dos ácidos 18:3 (n 3), 20:5 (n 3) e 22:6 (n 3), foram usadas para a obtenção das curvas de calibração para os três compostos, os valores do coeficiente de correlação (R^2) foram: 0,9999; 0,9991 e 0,9994 respectivamente ; calculados segundo Barbeto (2006). Essas curvas foram usadas para verificar a linearidade das concentrações empregadas, que representam a faixa de concentração em que os respectivos ésteres aparecem nas amostras. Como os valores de R^2 ($> 0,95$) são utilizados para descrever modelos lineares de distribuição de dados, relacionando-se matematicamente com o coeficiente de correlação de Pearson, pode-se notar que os dados possuem uma boa linearidade na faixa de concentração empregada.

Portanto, os valores da razão (área do padrão / área do P.I) foram utilizados para a obtenção do fator resposta para esses ésteres (Chui e Zucchini, 2001). A Tabela abaixo mostra os valores obtidos para as médias dos fatores resposta (Fr) dos referidos ésteres, calculados pela seguinte equação (Gonçalves, 2001):

Eq. 1
$$Fr = \frac{A_p.C_{PI}}{A_{PI}.C_p}$$

Onde:

A_p = área do padrão

A_{PI} = área do padrão interno

C_p = concentração do padrão

C_{PI} = concentração do padrão interno

Tabela 11 - Fatores de resposta e médias para os padrões utilizados na verificação de resposta do detector

Concentração	Fr (ML)	Fr EEPA	Fr EDHA
1	0,746	0,730	0,760
2	0,741	0,720	0,765
3	0,742	0,728	0,779
4	0,762	0,724	0,777
5	0,759	0,739	0,777
M_{fr} (C.V.)	0,750 (1,30)	0,725 (0,75)	0,772 (1,10)

ML: linolenato de metila

EEPA: éster metílico do ácido *cis*- 5,8,11,14,17- eicosapentaenóico

EDHA: éster metílico do ácido *cis*- 4,7,10,13,16,19- docosaheptaenóico

M_{fr} : média dos fatores de resposta

C.V: coeficiente de variação dos (Fr)

Não foi possível montar as curvas para os ésteres do padrão AOCS-007 porque se trata de uma mistura já contendo o éster utilizado como P.I, em quantidade pré-estabelecida. No entanto, as cinco diluições dessa mistura foram usadas para estimar o fator de resposta (Fr) para todos os componentes da mistura. Os valores médios e os coeficientes de variação são dados na Tabela 12.

Tabela 12 - Médias dos fatores de resposta para cada éster componente da mistura AOCS-07N

Saturação	Representação do ácido	M _{Fr}	C.V
Saturados	14:0	0,983	0,46
	16:0	0,995	0,50
	18:0	0,990	0,76
	20:0	0,999	0,20
	22:0	1,000	0,41
	24:0	0,997	0,45
Monoinsaturados	18:1 (n 9)	0,993	0,48
	20:1 (n 9)	0,993	0,73
Dinsaturados	18:2 (n 6)	0,804	0,57

M_{Fr}: média dos fatores de resposta

C.V: coeficiente de variação dos Fr para as diluições

Uma informação importante destaca-se nesse conjunto de dados da Tabela 12. Para cada diluição a resposta do detector se manteve linear em relação às áreas dos ésteres, pois os coeficientes de variação são pequenos, indicando que a diluição não afeta a resposta individual de cada componente da mistura. Com isso pode ser feita uma estimativa para se poder empregar a média dos fatores resposta na análise das amostras de óleo de mexilhão. Outro fato observado é a tendência dos ésteres com mais de uma insaturação possuírem fatores resposta relativamente diferentes dos demais.

Segundo Ribani *et al.* (2004), os parâmetros de quantificação podem ser calculados com os dados de desvio padrão de resposta e coeficiente angular da curva analítica. Seguindo esta lógica, foram calculados os limites de detecção e quantificação para o éster do ácido EPA, cujos valores são 6,01 mg L⁻¹ e 18,20 mg L⁻¹, respectivamente. Sendo esse éster o composto que apresenta o menor fator de resposta, é possível admitir que os limites quantificáveis para os demais ésteres, sejam menores, porem, a faixa de trabalho deve ser superior aos limites dados acima.

4.7.2. Análise quantitativa das amostras

Após definição de todos os parâmetros do item “4.7.1.”, teve início as injeções das amostras provenientes das quatro levas (para detalhes da injeção, ver 3.9.3.). Obtendo-se os cromatogramas de todas as amostras e suas duplicatas. Foi necessário encontrar a sequência de eluição comparando-a com os dados já obtidos para os padrões. Os resultados foram comparados com os reportados na literatura (AOAC, 1995; Passi *et al.*, 2002) que trazem a sequência de eluição para colunas com o mesmo tipo de fase de usada nesse trabalho. As sequências dos ésteres combinam-se perfeitamente, inclusive para os isômeros de posição de insaturação como: 18:1 n9 e 18:1n7. Apresenta-se abaixo um cromatograma para exemplificar o perfil dos ésteres do óleo dos mexilhões. Todas as amostras, sem exceção, possuem os mesmos ésteres identificados no cromatograma da Figura 15.

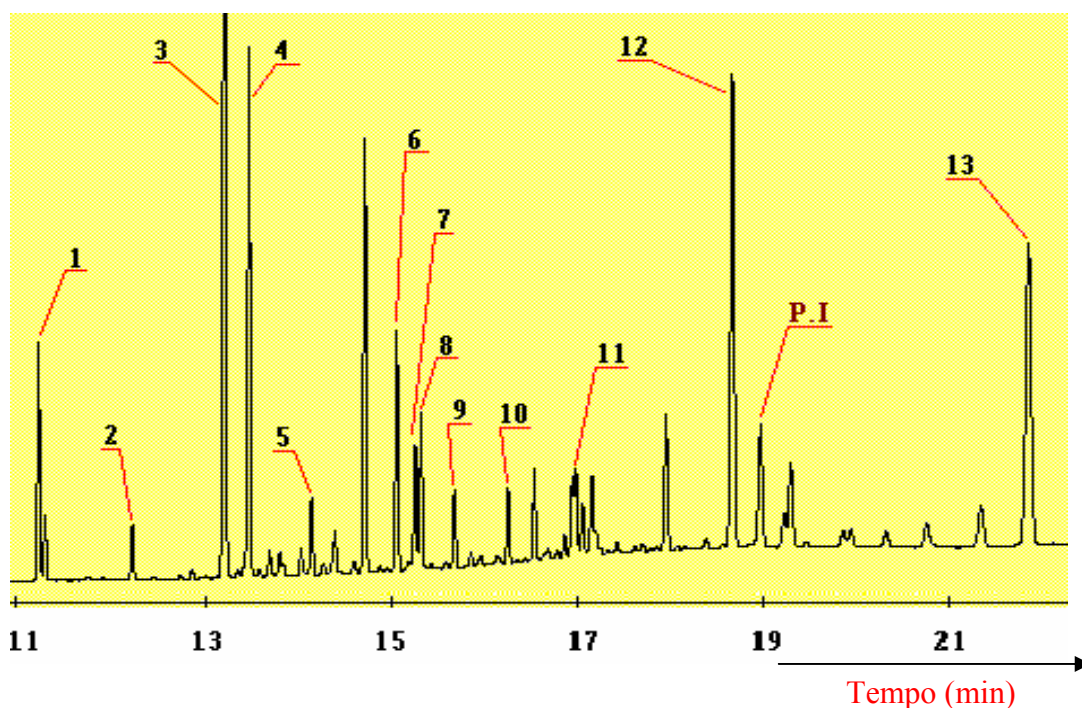


Figura 15. Cromatograma parcial com a sequência de eluição para as amostras do óleo dos mexilhões. Os ácidos são: 1) 14:0; 2) 15:0; 3) 16:0; 4) 16:1 (n 6); 5) 17:0; 6) 18:0; 7) 18:1 (n 9); 8) 18:1 (n 7); 9) 18:2 (n 6); 10) 18:3 (n 3); 11) 20:1 (n 9); 12) 20:5 (n 3); 13) 22:6 (n 3). Coluna polar CBP20.

4.7.2.1. - Comparação entre métodos de esterificação

Comparou-se as doze primeiras amostras, esterificadas pelos dois métodos, com o objetivo de obter informações sobre a eficiência da extração e o efeito da temperatura na formação dos ésteres, pois a esterificação com cloreto de acetila requer um tempo maior de aquecimento, o que poderia prejudicar a recuperação dos ésteres de ácidos polinsaturados (Tabela 13).

Tabela 13 - Dados para a comparação dos métodos de esterificação empregados nas duas frações das duas primeiras coletas

n°	Ácido	M1	M2	M1-2	C.V.
1	14:0	5,76	5,95	5,86	2,29
2	15:0	1,34	1,40	1,37	3,20
3	16:0	28,63	28,47	28,55	0,40
4	16:1 (n 6)	13,79	13,87	13,83	0,39
5	17:0	1,92	1,83	1,87	3,13
6	18:0	6,30	6,25	6,28	0,60
7	18:1 (n 9)	3,08	3,15	3,11	1,66
8	18:1 (n 7)	3,69	3,74	3,72	0,88
9	18:2 (n 6)	1,91	1,86	1,88	1,92
10	18:3 (n 3)	1,87	1,90	1,89	1,50
11	20:1 (n 9)	2,27	2,21	2,24	1,96
12	20:5 (n 3)	15,61	15,68	15,64	0,32
13	22:6 (n 3)	13,83	13,69	13,76	0,76

M1: média das amostras esterificadas com cloreto de acetila/metanol

M2: média das amostras esterificadas com BF₃/metanol

M1-2: média entre M1 e M2

C.V: coeficiente de variação entre as médias M1 e M2

Nota: M1 e M2 são médias percentuais das razões “área do éster / área do P.I”, sem a correção do fator resposta, que é desnecessário para essa comparação entre métodos.

Com os dados de diferença entre as razões (área do éster / área do P.I) para cada fração (1 e 2, esterificadas com métodos diferentes) das doze amostras individuais, pode ser aplicado um teste t para dados pareados. O teste visa comparar as médias (entre duplicatas das frações 1 e 2) para obter a significância entre os valores. O cálculo foi realizado segundo Barbeto (2006), e o valor encontrado para t é menor do que o valor tabelado para uma probabilidade de significância igual a 0,05. Isso indica que há diferenças significativas entre as médias. O coeficiente de variação das médias totais (M1 e M2) das frações 1 e 2 possui valores significativos porque reflete a diferença entre os valores individuais que compõem as médias. Por este motivo se usa o teste pareado, que se baseia apenas nas diferenças entre médias das duplicatas para as frações 1 e 2. Aplicou-se esse teste para todas as amostras, considerando as diferenças entre as médias das duplicatas de ambas as frações (1 e 2). Os valores são muitos e não serão mostrados.

A precisão entre os dois métodos é comparada utilizando o teste F de Snedecor, no qual os valores das variâncias são comparados para probabilidade de significância de 0,05. Para esse teste foi utilizada a média das variâncias de cada éster individualmente, ou seja, para cada duplicata criou-se uma variância. A média entre elas foi calculada para cada éster individualmente. O valor de F foi calculado para cada éster das frações (1 e 2) esterificada com os diferentes métodos. Em todos os casos o valor de F calculado ficou abaixo do valor tabelado, indicando que os dois métodos de esterificação possuem precisões comparáveis, o que não ocorreu com as médias das duplicatas (frações 1 e 2) para cada amostra (Murry, 2000).

É possível dizer então que os métodos têm precisões comparáveis, devido às condições uniformes, tanto na formação dos ésteres, pelos reagentes, quanto na resposta do aparelho de análise (CG), para cada método individualmente. Porém ocorre uma diferença considerável quando se compara as médias das duplicatas de cada amostra esterificada entre os dois métodos, para nível de significância de 0,05. Os valores das médias totais, dados na Tabela 13 indicam que a diferença ocorre ao acaso, pois não houve queda nos valores percentuais dos polinsaturados que pudesse sugerir uma relação entre o maior tempo de aquecimento e a degradação ou não durante a esterificação dos mesmos. Para um melhor resultado, poderia ter sido usado uma mistura de padrões de ácidos, caso esta estivesse disponível.

4.7.2.2. Análise das amostras provenientes das quatro coletas

Finalmente, todas as amostras das quatro coletas puderam ser analisadas e comparadas, coleta por coleta. A Tabela abaixo traz os resultados na forma de médias dos valores médios entre duplicatas de mesma amostra, separados em quatro grupos denominados pelas letras A, B, C e D empregadas para designar as quatro coletas realizadas em diferentes períodos do ano.

Tabela 14. Média dos valores médios (em percentagem) entre duplicatas para cada coleta de seis indivíduos

Ácido	M_A	C.V _A	M_B	C.V _B	M_C	C.V _C	M_D	C.V _D
14:0	5,36	9,62	5,82	5,16	7,52	9,30	7,11	12,88
15:0	1,19	3,06	1,36	5,00	1,36	11,54	1,39	14,15
16:0	25,47	4,31	25,22	3,74	30,54	10,94	25,84	8,45
16:1 (n 6)	11,80	10,18	12,64	3,99	13,00	1,40	12,15	5,36
17:0	1,66	4,54	1,71	5,72	1,89	13,72	1,70	11,89
18:0	5,33	2,79	5,29	5,03	6,98	14,48	5,64	12,54
18:1 (n 9)	2,34	22,43	1,59	21,64	1,46	12,02	1,03	14,39
18:1 (n 7)	3,40	3,83	3,88	6,77	4,22	4,75	4,06	5,70
18:2 (n 6)	1,82	7,44	1,73	8,54	1,79	11,05	1,45	13,30
18:3 (n 3)	1,82	10,36	1,27	5,34	1,28	12,41	1,14	7,46
20:1 (n 9)	2,18	7,22	1,35	11,26	1,75	15,52	1,97	8,16
20:5 (n 3)	19,84	4,01	20,72	4,44	15,52	22,83	22,25	9,99
22:6 (n 3)	17,79	8,11	17,42	4,64	12,67	18,81	14,25	12,94

A, B, C, D: referente às quatro coletas realizadas em diferentes períodos do ano.

M: referente à média dos valores médios entre duplicatas de mesma amostra

C.V (%): referente ao coeficiente de variação para cada coleta A, B, C, D

Todas as médias das duplicatas utilizadas para criar as médias correspondentes a cada coleta foram calculadas a partir dos valores das razões entre áreas (éster/P.I). Esses

valores foram corrigidos com a aplicação do fator resposta para todos os ésteres individualmente, pois cada um deles possui o valor do fator resposta dado na Tabela 12, com exceção dos ésteres dos ácidos 15:0, 17:0 e 18:1 (n 7). Para esses últimos, calculou-se uma média dos fatores de resposta médios (Tabela 12), baseado na semelhança de suas estruturas. Para os ésteres dos ácidos 15:0 e 17:0 foi aplicado o fator resposta dos ésteres de ácidos saturados. Já os fatores dos monoinsaturados foram aplicados no cálculo do fator de resposta corrigido para o éster do ácido 18:1 (n 7). É seguro aplicar esse cálculo porque o fator resposta para os grupos não varia significativamente, como comprovam os coeficientes de variação dos ésteres na Tabela 12. Com os valores de razão corrigidos pelo fator resposta, tornou-se possível calcular o percentual dos ésteres em cada duplicata, de cada amostra injetada. Logo, os valores de M_A, M_B, M_C e M_D que se encontram na Tabela 14 são as média dos valores médios entre duplicatas, em percentagem, para cada coleta de mexilhão feita ao longo do ano.

Não é possível aplicar uma comparação estatística para níveis de probabilidade que sejam confiáveis para admitir uma significância entre as médias. Tentativas de aplicação do teste F e t não resultaram em valores que demonstrassem um aumento ou redução tendenciosa no percentual para algum éster. Os valores aparentemente estão orientados ao acaso.

Com os valores de médias das coletas, dados na Tabela 14, foram criadas as médias gerais para as quatro coletas agrupadas. A tabela seguinte mostra esses valores e as amplitudes (menor e maior valor) entre as quatro coletas.

Tabela 15 - Médias gerais das quatro coletas agrupadas

n°	Ácido	Médias Gerais	Intervalo de confiança	Amplitude
1	14:0	6,45	1,64	5,36 – 7,52
2	15:0	1,32	0,15	1,19 – 1,39
3	16:0	26,77	4,02	25,22 - 30,54
4	16:1 (n 6)	12,40	0,84	11,80 – 13,00
5	17:0	1,74	0,16	1,66 – 1,89

6	18:0	5,81	1,27	5,29 – 6,98
7	18:1 (n 9)	1,61	0,87	1,03 – 2,34
8	18:1 (n 7)	3,89	0,56	3,40 – 4,22
9	18:2 (n 6)	1,70	0,27	1,45 – 1,82
10	18:3 (n 3)	1,38	0,48	1,14 – 1,82
11	20:1 (n 9)	1,82	0,56	1,35 – 2,18
12	20:5 (n 3)	19,58	4,59	15,52 – 22,25
13	22:6 (n 3)	15,53	3,94	12,67 – 17,79

4.7.3. Interpretação dos resultados para as coletas

Para compreender melhor a distribuição dos dados, encontrados para cada coleta, foram criados alguns gráficos utilizando o programa Excel 2000. Os dados empregados para construir os gráficos estão na tabela 14. Também foi utilizado um conjunto de médias calculados com base nas médias de temperaturas, da água do mar, retiradas da página do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM). Essas médias foram calculadas considerando o mês anterior e o mês da coleta, para melhor representatividade da variação de temperatura sofrida pelos mexilhões. Os valores estão na tabela abaixo (Tabela 16).

Tabela 16 - Médias dos valores médios de temperatura da água do mar baseados no mês anterior e atual da coleta

Bimestre	Mês anterior	Mês da coleta	Médias	C.V
1	outubro	novembro	20,82	4,92
2	janeiro	Fevereiro	27,13	0,05
3	março	Abril	25,66	10,17
4	maio	Junho	18,88	1,99

Os dados da Tabela 16 são empregados no gráfico de linha-coluna mostrado abaixo (Figura 16).

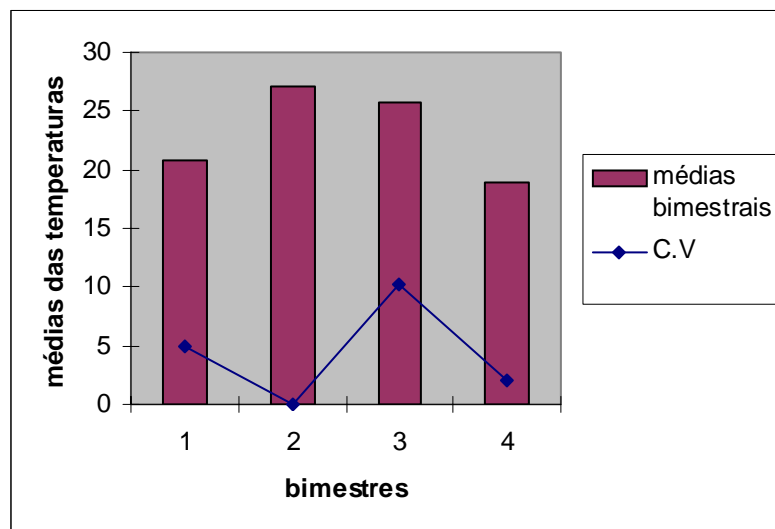


Figura 16. Gráfico de linha-coluna para os dados da Tabela 16

No gráfico da Figura 9 fica evidenciado o aumento das temperaturas no segundo e terceiro bimestre, em comparação com o quarto bimestre, quando ocorreu a menor média de temperatura. A linha do coeficiente de variação demonstra que houve uma queda acentuada iniciando no primeiro mês do segundo bimestre e prolongando-se até o final do quarto bimestre. O período escolhido para as quatro coletas reflete consideravelmente as diferentes variações de temperaturas durante o ano. Caso exista uma relação entre as alterações dos perfis dos ácidos graxos e a temperatura, deveria acontecer do segundo para o quarto bimestre.

Para localizar uma possível tendência dos ácidos graxos variarem conforme a temperatura, foi construído um gráfico de colunas, no qual é possível visualizar as médias dos percentuais encontrados, dadas na Tabela 15, para cada coleta relacionada com as temperaturas bimestrais (Figura 17)

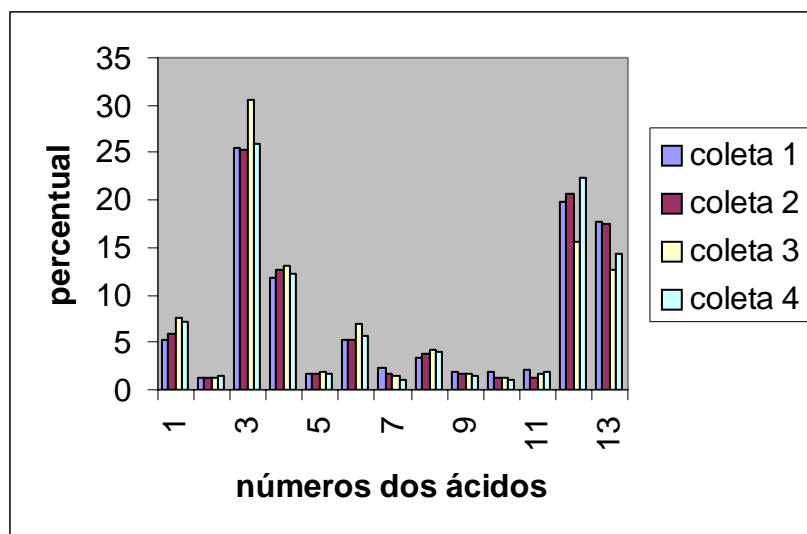


Figura 17 - Médias dos percentuais agrupadas por coleta. Os ácidos são: 1) 14:0; 2) 15:0; 3) 16:0; 4) 16:1 (n 6); 5) 17:0; 6) 18:0; 7) 18:1 (n 9); 8) 18:1 (n 7); 9) 18:2 (n 6); 10) 18:3 (n 3); 11) 20:1 (n 9); 12) 20:5 (n 3); 13) 22:6 (n 3).

Visualmente, pode ser notado uma uniformidade em relação ao perfil dos ácidos. Não ocorrem anomalias que mostrem um aumento diferenciado em qualquer grupo. Isso acontece principalmente com os ácidos que estão presentes em menor quantidade. O perfil se mantém, o ácido de número cinco (17:0), por exemplo, não se torna maior em quantidade do que o ácido de número onze (20:1). Um aumento na quantidade dos ácidos saturados, principalmente os de número par de carbonos, parece ter ocorrido durante as duas últimas coletas. Os maiores valores de percentuais desses ácidos aconteceram justamente no terceiro bimestre, que apresentou a maior variação de temperatura entre seus meses. Foi o período de queda acentuada, no qual a temperatura passou de 27,5 para 23,81 °C, e daí por diante diminuiu até o valor mínimo do período de coleta. Nota-se também que, para os dois últimos bimestres o percentual dos ácidos saturados de números pares de carbono aumentou sempre proporcionalmente em relação aos dois primeiros bimestres, e na terceira coleta eles são mais abundantes do que na quarta, considerando os três ácidos pares saturados, uniformemente. Não é observado o mesmo aumento para os de número ímpar como 15:0 e 17:0.

Em contrapartida, os ácidos polinsaturados parecem ter sofrido uma queda durante os meses de temperatura menor. Para o ácido 18:3 (n 3), a queda nos percentuais é muito pequena para ser percebida, em função do baixo valor percentual desse ácido, mas para os

ácidos EPA e DHA a queda nos percentuais pode ser notada na terceira coleta. Na quarta coleta os valores voltaram a aumentar. É possível perceber a diferença entre os ácidos ômega 3 (EPA, DHA e 18:3), se forem agrupados e relacionados separadamente em um gráfico de colunas e linhas, indicando-se as variações de temperaturas bimestrais no segundo eixo, como é apresentado a seguir (Figura 18).

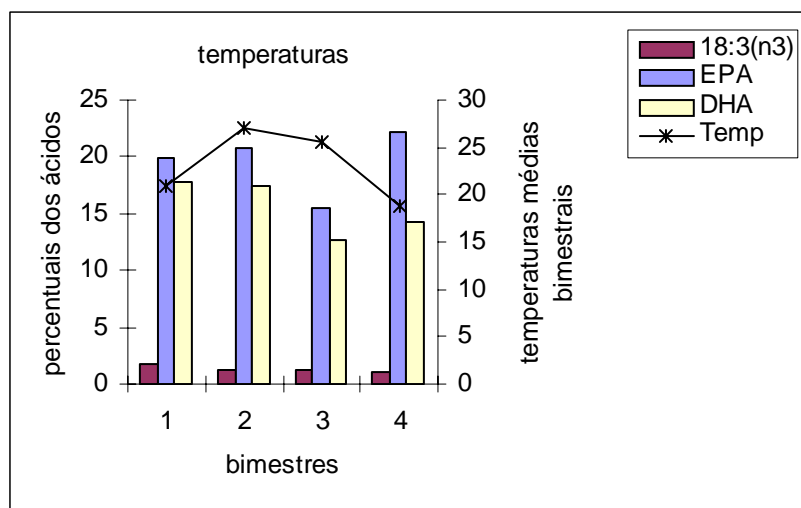


Figura 18 - Gráfico de colunas e linhas em dois eixos para os ácidos ômega 3 (n 3)

Nota-se que o percentual de EPA é sempre maior do que o de DHA. Esse padrão é observado também em 96 % dos 24 indivíduos analisados, apenas um deles apresentou o contrário. Esse fato passaria despercebido se fosse analisado um conjunto de amostras nas quais vários animais são unidos em uma amostra só, como é realizado em alguns trabalhos. Observando a linha de temperatura em relação ao terceiro bimestre, pode-se perceber uma redução nos percentuais de EPA e DHA, que aumentam novamente no quarto semestre. Nesse último semestre, as temperaturas não sofrem uma queda acentuada, a diferença entre os meses que integram esse bimestre não passam de 1,2 % da média, ou seja, a estabilidade de temperatura é elevada.

Algumas similaridades entre as variações nos percentuais dos ácidos puderam ser observadas com a análise dos coeficientes de variação. Graficamente é notado uma pequena semelhança entre os períodos de coleta, como mostram os gráficos abaixo:

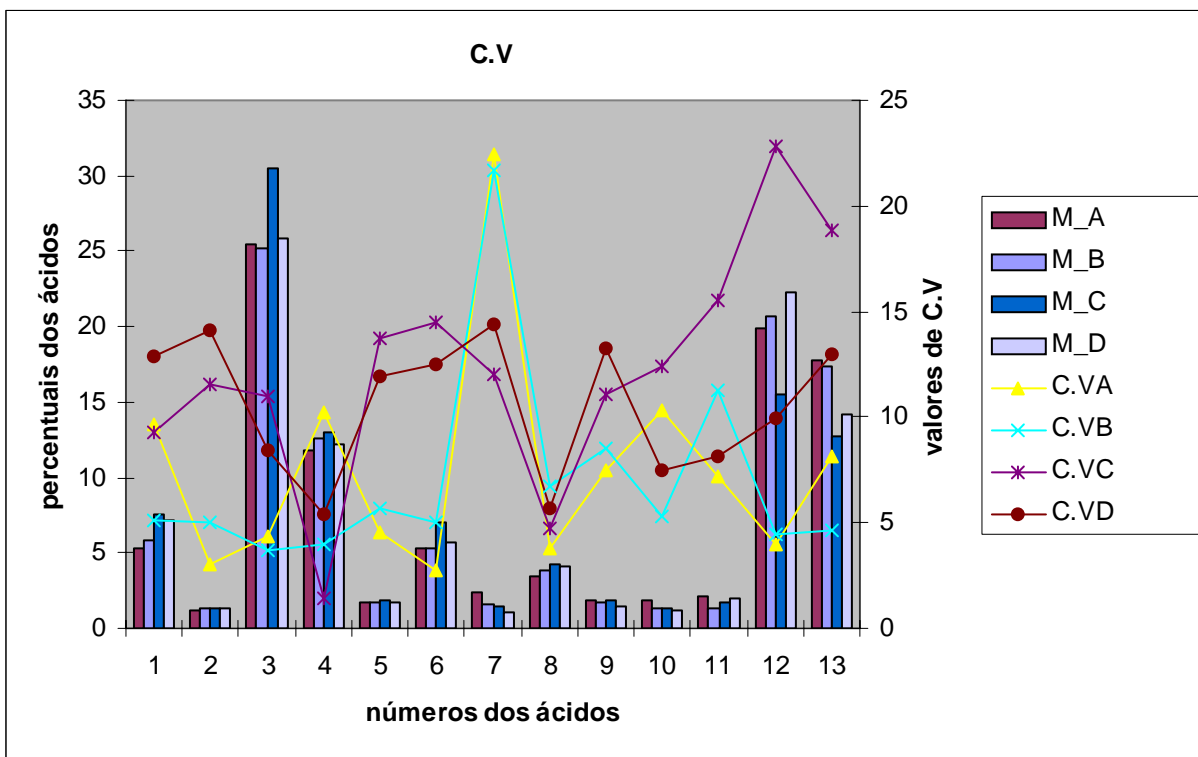


Figura 19 - Gráfico de colunas e linhas em dois eixos com os valores de percentuais dos ácidos e coeficientes de variação.

Na Figura 19 aparece a significância do coeficiente de variação em função das quatro diferentes coletas. De acordo com esse gráfico, ocorrem variações desiguais nos percentuais dos ácidos, no entanto, algumas semelhanças sutis são percebidas. As linhas que representam os coeficientes de variação para as duas primeiras coletas (A e B), têm um valor máximo registrado sobre o mesmo ácido [(18:1 n 9)(número 7)], isso significa que ocorreram diferenças elevadas nos percentuais individuais desse ácido para o período em que a estabilidade da temperatura era maior. Para os ácidos 6 (18:0) e 8 (18:1 n 7), as mesmas linhas estão assumindo valores relativamente mais baixos, indicando que as variações individuais desses ácidos não foram significativas em relação à variação do seu isômero de número 7 (18:1 n 9). Outras variações não são tão perceptíveis como essa última, elas ocorrem em escala menor, portanto, foi necessário o emprego de outro gráfico de colunas para visualizar as diferenças nas variações individuais dos mexilhões submetidos ao estudo desse trabalho.

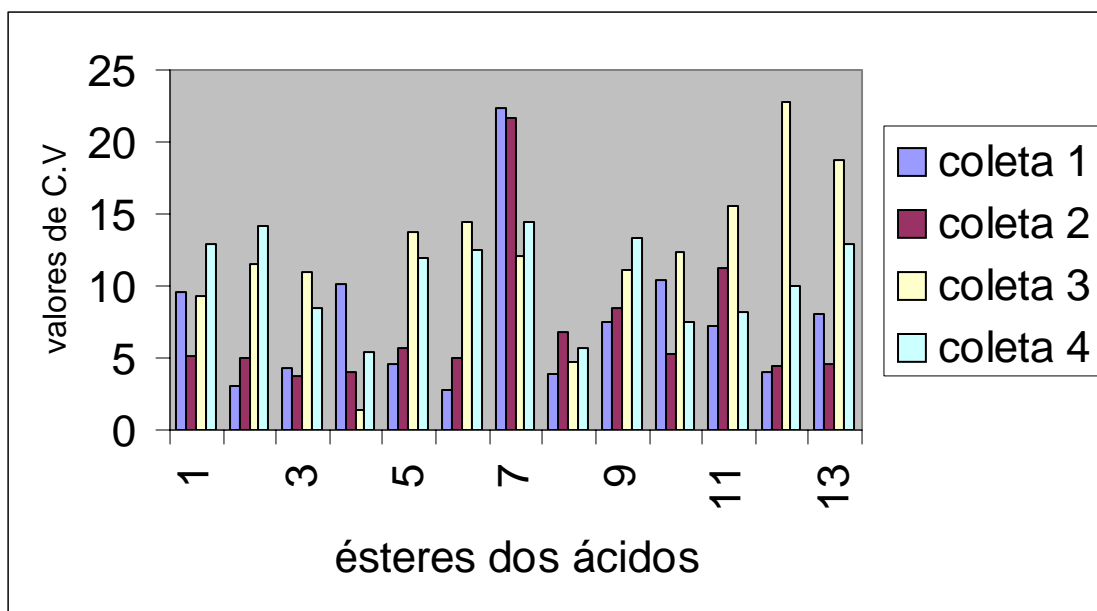


Figura 20. Gráfico de colunas para os valores dos coeficientes de variação dos ácidos em cada coleta.

No gráfico representado na Figura 20 fica mais fácil perceber as variações individuais entre as duas primeiras e as duas ultimas coletas. Para 61,5 % dos ácidos, os coeficientes de variação das duas ultimas coletas são maiores que os das primeiras. Entre eles estão os dois ômega 3 de maior abundancia no óleo dos mexilhões (EPA e DHA). O período em que essa variação ocorreu foi nos bimestres de menor temperatura, e percebe-se que a variação atinge mais o EPA do que o DHA desse período.

A interpretação dos gráficos demonstra que pode haver uma mudança no perfil de alguns ácidos, principalmente saturados e polinsaturados de acordo com períodos de instabilidade e estabilidade de temperatura, porem as relações com os fatores ambientais e metabólicos são difíceis de comparar em pesquisas com amostras em habitats sem controle de todos os fatores envolvidos.

5. CONCLUSÃO

Em termos gerais, o método para determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa é eficiente, principalmente para resultados quantitativos. No entanto, para garantir a caracterização é essencial o uso do espectrômetro de massas e dos padrões dos ácidos de interesse, pois diminui as chances de identificação duvidosa de compostos e isômeros. O cálculo do fator de resposta também deve ser empregado, principalmente quando se quer determinar o percentual dos ácidos polinsaturados, em os valores desse fator são mais significantes para se obter a quantidade real dos mesmos.

Estatisticamente não foi possível obter respostas significativas para as pequenas variações dos ácidos graxos presentes no óleo extraído dos mexilhões. No entanto, a interpretação dos percentuais utilizando gráficos, relacionados com as temperaturas dos períodos de coleta, demonstraram que algumas variações de percentuais podem ocorrer nos meses em que as médias de temperatura variam mais, indicando uma possível mudança na incorporação ou produção dos ácidos.

Claramente se percebe que a quantidade de ômega-3 no óleo dos mexilhões é bastante significativa se comparada com outras fontes como peixes e crustáceos, suas amplitudes também informam que as variações sutis nas quantidades tornam o perfil bastante estável. Para fins nutricionais, eles podem ser utilizados com segurança para comparações com outros perfis, de gorduras animal e vegetal. Ainda não se tem informações sobre o uso do óleo de mexilhão *perna perna* para fins comerciais ou medicinais, embora o teor de polinsaturados seja relativamente alto, assim como o de alguns ácidos saturados também necessários para dietas que contenham polinsaturados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vasc. Br.**, v. 3(2), 2004, p. 145-154.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Ed. Artmed, RS, 2006, p. 61-62.
- A.O.A.C. – **Official Methods of Analysis**. 16nd. ed. Virgin, USA, 1995, cap. 41, p. 17-23.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. 2. ed. Ed. UFV, MG, 1999, p. 195-200.
- BANG, H.O.; DYEBERG, J.; HJORNE, N. The composition of food consumed by greenland Eskimos. **Acta. Med. Scand.** 1976:200:69-73.
- BARBETTA, P. A. **Estatística aplicada às ciências sociais**. 6. ed. Ed. da UFSC, SC, 2006, p. 195-223.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. Ed. W. H. Freeman, New York, 2002, p. 320-344.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. Ed. Varela, SP, 2001, p. 33-45.
- BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; BUCKRIDGE, M. S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de Jacarandá-da-Bahia osmocondicionadas. **Rev. Bras. Fisio. Veg.**, v. 13(1), 2000, p. 10-16.
- BORGES, V.C.; WAITZBERG, D.L. **Nutrição enteral e parenteral na prática clínica**. 2. ed. Ed. Atheneu, RJ, 1995, p. 24 e 485.

- BRAGAGNOLO, N.; AMAYA, D. B. R. Teor de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v 22, 2002, p. 98-103.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Ed. Artmed, RS, 2002, p. 177-193.
- CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical trauma patients. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 36(4), 2003, p. 433-446.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Ed. Artmed, RS, 2000, p. 546-569.
- CARVALHO, P. *et al.* Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova**, v. 26(1), 2003, p. 75-80.
- CHANEY, S. G. **Princípios de nutrição**. 4. ed. Ed. Edgard Blucher, SP, 1998, p. 926.
- CONNOR, W.E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, 2000, p. 171-174.
- COSTA, N. M. B.; BORÉM, A. **Biotecnologia e Nutrição**: saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos. Ed. Nobel, SP, 2003, p. 23.
- CUERVO, L. M. M. *et al.* Análisis de ácidos grasos de cepas de *mycobacterium habana* y *mycobacterium simiae*. **Rev. Cub. Med. Trop.**, v. 51, 1999, p. 106-115.
- CUNHA, C. A. C. **Identificação e quantificação do teor de ácidos graxos poliinsaturados - ômega 3 - em frangos de corte**. Florianópolis, 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 7-25.

- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Bio. Ciênc. Desenv.** ano IX, v. 36, 2006, p. 40-46.
- CURI, R. *et al.* Uma etapa limitante para a oxidação dos ácidos graxos durante o exercício aeróbio: o ciclo de Krebs. **Rev. Bras. Ciênc. Mov.**, v. 11, 2003, p. 87-94.
- CURTIUS, A. J.; SEIBERT, E. L.; FIEDLER, H. D. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura resultados parciais de um estudo de caso realizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Quim. Nova**, v. 26(1), 2003, p. 44-52.
- DANNENBERGER, D. *et al.* Effect of diet on the deposition of n-3 fatty acids, conjugated linoleic and c18 *trans* fatty acids isomers in muscle lipids of german holstein bulls. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, 2004, p. 6607-6615.
- DONNELLY, J. K.; ROBINSON, D. S. Free radical in food. **Free Radical Research**, v. 22(2), 1995, p. 147-175.
- DUTRA, J. E. O.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. Ed. Sarvier, SP, 2003, p. 88-97.
- DYERBERG, J. ; BANG, H.O.; HJORNE, N. Fatty acid composition of the plasma lipid in Greenland Eskimos. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 28, 1975, p. 958-66.
- EDER, K. Gas chromatographic analysis of fatty acids methyl esters. **J. Chromatogr. B**, 671, 1995, p. 113-131.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. Ed. Atheneu, SP, 1998, p. 389-390.
- FERRER, P. A. R. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación del lactante. **Arch. Argent. Pediatr.**, v. 98(4), 2000, p. 231-238.

- FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, É. T. G. Ácidos orgânico. **Quim. Nova**, v. 15(2), 2002, p. 6-8.
- FOLCH, J.; LEES, M. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol.Chem.**, 1951, 191, p. 807.
- FOWLIS, I. A. **Gas chromatography**: analytical Chemistry by open learning. 2nd. ed. ACOL (University of Greenwich), 1999, p. 74-130.
- GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções**. 4. ed. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001, p. 730-787.
- GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G.; ANDO, M. Y. Otimização de reação de interesterificação química do óleo de palma. **Quim. Nova**, v. 28 (4), 2005, p. 633-636.
- HADAD, A. N.; IBARRA, E. M. Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado, lo bueno y lo malo. **Rev. Cub. Med.**, v. 42(2), 2003, p. 49-55.
- HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease, **Nutr. Rev.**, v. 55, 1997, p. 44-52.
- HANSEL, F. A. **Análise de biomarcadores lipídicos em sedimentos de manguezais**. Florianópolis, 2000. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina, p. 37-41.
- HENRIQUES, M. B. **Resistência do mexilhão *perna perna* (LINNAEUS, 1758) proveniente de bancos naturais da Baixada Santista, a variação de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo**. Rio Claro, 2004, tese de Doutorado- Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista, p. 7-8.

HOPFER, U. **Digestão e absorção de constituintes nutricionais básicos**. 4. ed. Ed. Edgard Blucher, SP, 1998, p. 907-909.

ISO. Preparation of fatty acid methyl esters. International Standard ISO, **15884-IDF 182**, 2002.

JEFFERY, G. H. *et al.* **Análise química quantitativa**. 5. ed. Ed. LTC, RJ, 1992, p. 194-206.

JORGE, P.A.R. *et al.* Efeito dos ácidos graxos ômega-3 sobre o relaxamento dependente do endotélio em coelhos hipercolesterolêmicos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 69(1), 1997, p. 13-18.

JUSTI, K. C. *et al.* Efeito da temperatura da água sobre desempenho e perfil de ácidos graxos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta. Sci. Anim. Sci.**, v. 27(4), 2005, p. 529-534.

KÄKELÄ, R.; HYVÄRINEN, H. Composition of polyunsaturated fatty acids in the liver of freshwater and marine ringed seals (*Phoca hispida ssp.*) differ largely due to the diet of the seals. **Comp. Biochem. Phys.**, 1998, p. 231-237.

KANG, J. X.; WANG, J. A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. **BCM Biochem.**, v. 6, 2005, p. 1-4.

KIM, E. M.; STEEL, C. J.; CHANG, Y. K. A influência do processamento sobre a retenção de ácidos graxos ômega-3 adicionados ao pão de forma. **Braz. J. food Technol.**, v. 8(4), 2005, p. 268-276.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutr. Rev.**, New York, v. 51(2), 1993, p. 33-40.

- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Ed Sarvier, SP, 1995, p. 179-198, 477-512.
- LIMA, F. E. L. *et al.* Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 13(2), 2000, p. 73-80.
- LOPES, D. *et al.* Caracterização química do Fruto do Mapati (*pourouma cecropifolia martius- Maraceae*). **Braz. J. food technol.**, v. 2 (1), 1999, p. 45-50.
- MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência de nitrogênio no cultivo de *spirulina maxima* em níveis de temperatura-Parte II: Produção de lipídios. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21(2), 2001, p. 183-189.
- MAGALHÃES, A. R. M. **Efeito da parasitose por trematoda bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões perna perna (L.)**. São Paulo, 1998. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, p. 2-160.
- MAHAN, L. K. **Nutrição e dietoterapia**. Ed. Roca Ltda, SP, 1998, p. 50-61.
- MAIA, L. E.; AMAYA, D. B. R. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídeos de diversas espécies de peixes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 53(2), 1993, p. 27-35.
- MARTIN, C. A.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Ácidos graxos *trans*, implicações nutricionais de fontes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17(3), 2004, p. 361-368.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Ed. Guanabara Koogan S.A., RJ, 1999, p. 200-202.

- MEDEIROS, K. J. Avaliação dos efeitos de uma dieta à base de mexilhões perna-perna aos teores de colesterol, triglicerídeos e lipoproteínas em cobaias (*cavia porcellus*). Florianópolis, 2001. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina, p. 30-50.
- MEIER, S.; MJOS, S. A.; NIELSEN, O. G. Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. **J. Chromatogr. A**, 1104, 2006, p. 291-298.
- MITCHELL, H. S. *et al.* **Nutrição**. 10. ed. Ed Interamericana, RJ, 1997. p. 24-258.
- MORELATTO, J. C. **Estudo da composição da gordura de suínos terminados em dois sistemas intensivos de criação: confinamento e ao ar livre**. Florianópolis, 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 15-50.
- MORETTO, E. *et al.* **Introdução à ciência de alimentos**. Ed. Da UFSC, SC, 2002, p. 109-114.
- MOSCHEN, F. V. A.; CERQUEIRA, V. R. **Efeito da artemia enriquecida com ácidos graxos essenciais na larvicultura do robalo-peva *Centropomus parallelus* (Poey, 1860)**. Florianópolis, 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 2-17.
- MOURA, J. G. P. **A revolução dos nutrientes**. 2. ed. Ed. Livraria Mundial, RS, 1998, p.175-182.
- MURRY, R. S. **Estatística**. Ed. Mcgraw-Hill, Portugal, 2000, p. 76-121.
- NIELSEN, K. S. **Fisiologia animal**. 5. ed. Ed. Livraria Santos Editora Com.Imp. Ltda, SP, 2002, p. 135-173, 283.

NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químico e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. Ed IMESP, SP, 1985, p. 2.

O LAN ONLINE. **Tecnologia do pescado**. [on line]. Disponível na internet via: www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Tecnologia%20do%20Pescado. Capturado em 16 de outubro de 2004.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos**: Componentes dos alimentos e processos. Ed. Artmed, RS, v. 1, 2005, p. 13.

ORNELLAS, L. H. **A alimentação através dos tempos**. Ed. da UFSC, Florianópolis, SC, 2000, p. 72-231.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: método tradicionais, modificados e alterados. **Quím. Nova**, v. 28(4), 2005, p. 655-663.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Challenges with fats and fatty acid methods. **J. Anim. Sci.**, v. 81, 2003, p. 3250-3254.

PARDINI, R. S.; WILSON, D.; SCHIFF, S.; BAJO, S. A.; PIERCE, R. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids in case of Malignant Fibrous Histiocytoma of the Lungs. **Nutr. Canc.**, v. 52(2), 2005, p. 121-129.

PASSI, S.; CATAUDELLA, S.; MARCO, P.; SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different mediterranean marine species of fish and shellfish. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, 2002, p. 7314-7322.

- PATIN, R. V.; VÍTOLO, M. R.; VALVERDE, M. A.; CARVALHO, P. O.; PASTORE, G. M.; LOPEZ, F. A. The influence of sardine consumption on the omega 3 fatty acid content of mature human milk. **J. Pediatr.**, v. 82(1), 2006, p. 63-69.
- PIMENTEL, S. A.; TAKEMOTO, E.; RODRIGUES, R. S. M.; BADOLATO, E. S. G. Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 61(2), 2002, p. 69-75.
- PRATES, J.A.M. e MATEUS, C.M.R. **Componentes com actividade fisiológica dos alimentos de origem animal**. Revista portuguesa de ciências veterinárias, 2002. Disponível na internet via: www.rpcv.fmv.utl.pt/PDF/pdf3_2002/componentes. Capturado em 16 de outubro de 2004.
- RAVEN, H. P.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Ed. Guanabara Koogan S.A., RJ, 2001, p. 22-25.
- REDA, S. Y.; LEAL, E. S.; BATISTA, E. A. C.; BARANA, A. C.; SCHNITZEL, E.; CARNEIRO, P. I. B. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25(4), 2005, p. 672-676.
- REGO, O. A. **Suplementação de vacas leiteiras com óleo de peixe**. 2003. [on line]. Disponível na internet via: www.angra.uac.pt/.../MPA/P%E1ginas%20do_%20Mestrado/Mestrado/Prod.%20de%20Ruminantes/Oldemiro/O.%20Peixe. Capturado em 16 de outubro de 2004.
- RUPPERT, E. E. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. Ed Roca, SP, 1996, p. 412-449.

- SABARENSE, C. M. **Avaliação do efeito dos ácidos graxos *trans* sobre o perfil dos lipídios teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos graxos essenciais**. 2003. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, p. 4-12.
- SALÁN, E. O. **Tratamento térmico de mexilhões perna-perna como forma de assegurar a qualidade – avaliação de crescimento de *bacillus cereus* e de *staphylococcus aureus***. 2005. Dissertação (mestrado). Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, SP, p 6-13.
- SÁNCHEZ, M. D. Estudio sobre los ácidos grasos libres em queso blanco Venezolano. **Rev. de la facultad de farmacia**, v. 46 (2), 2004, p 29-31.
- SANIBAL, E. A. A.; MANCINI FILHO, J. Perfil de ácidos graxos *trans* de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24(1), 2004, p. 27-31.
- SCHAEFER, E. J.; AUDELIN, M. C.; MCNAMARA, J. R. Comparison of fasting and postprandial plasma lipo-proteins. **Am. J. Cardiol.**, v. 88, 2001, p. 1129-1133.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Ed. LTC, RJ, 2000, p. 2-30.
- SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. **Am. Chem. Soc.**, 1994, p. 20-33.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Ed. Bookman, RS, 2002, p. 620- 622.
- STEINHART, H.; BIERNOTH, G. Lipids in nivel food. European journal of lipids **Sci. Technol.**, v. 103, 2001, p. 40-41.

TRAMONTE, V. L. C. G. *et al.* **Valor nutritivo de preparações com mexilhões e ostras da região de Florianópolis, SC. 3º SIMPOCAL**, 2005.

VIANNI, R. e BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Quim. Nova**, v. 19(4), 1996, p. 400-407.

WARDLAW, G. M. **Nutrition**. 3rd. ed. Ed. Mosby-Year book, St. Louis-Missouri, 1996, p. 110-113.

WERNER, S. A.; LUEDECKE, L. O.; SHULTZ, T. D. Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three cheddar-type cheeses: effects of cheese cultures, processing, and aging. **J. Agric. Food chem**, v. 40, 1992, p. 1817-1821.

WILLIAMS, S. R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. 6. ed. Ed Artes Médicas, RS, 1997, p. 70.

WU, D.; MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M.; HAYEK, M. G.; HUTH, P.; NICOLosi, R. J. Immunologic effects of marine and plant derived n-3 polyunsaturated fatty acids in nonhuman primates. **Am. J. Clinic. Nutr.**, v. 63(2), 1996, p. 273-280.

ANEXOS

Anexo I- Fórmulas

Teste F

$$F = \frac{S_A^2}{S_B^2}$$

S_A : desvio padrão de valores para uma amostra A

S_B : desvio padrão de valores para uma amostra B

Teste t-student para comparação entre médias

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_p \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}}$$

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2) - 2}}$$

\bar{x} : média de n valores para uma amostra

n: número de amostras

S_p : desvio padrão agregado

S: desvio padrão

Anexo II. Mapas

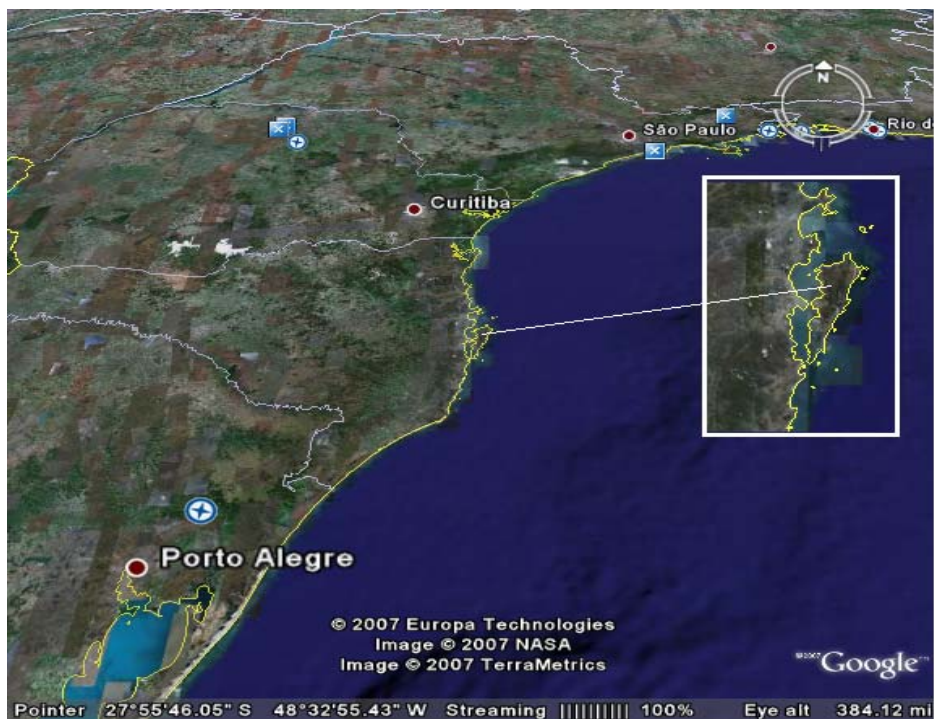


Figura 1. Mapa indicando o estado e a Ilha de Santa Catarina (ampliação)
Fonte: Google Earth, obtida em 05/02/2007



Figura 2. Mapa ampliado da região de Sambaqui.
Fonte: Google Earth, obtida em 05/02/2007

Anexo III. Local de coleta e espinheis

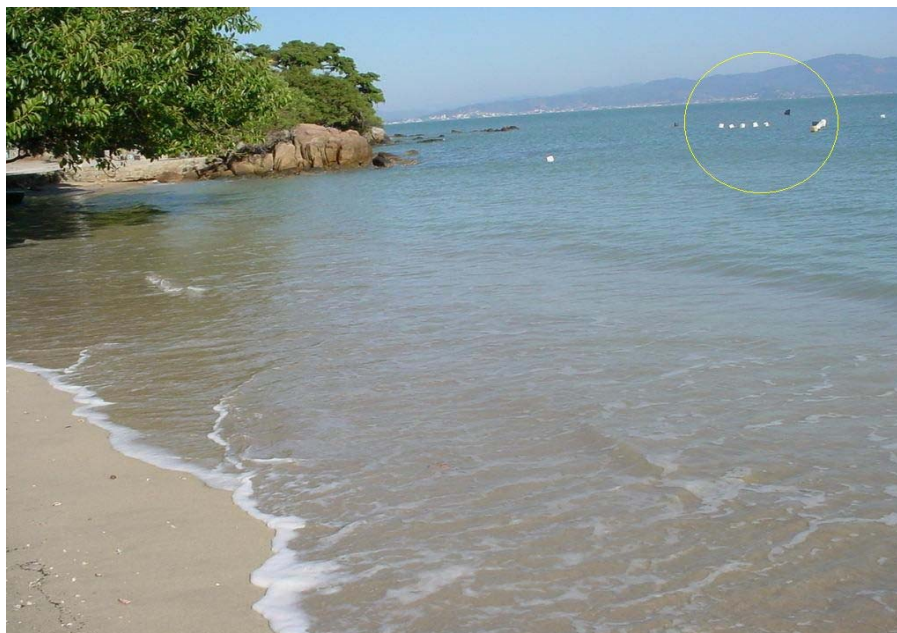


Figura 3. Foto do local de coleta: Sambaqui (Florianópolis-SC), em destaque os flutuadores dos espinheis (circulado).

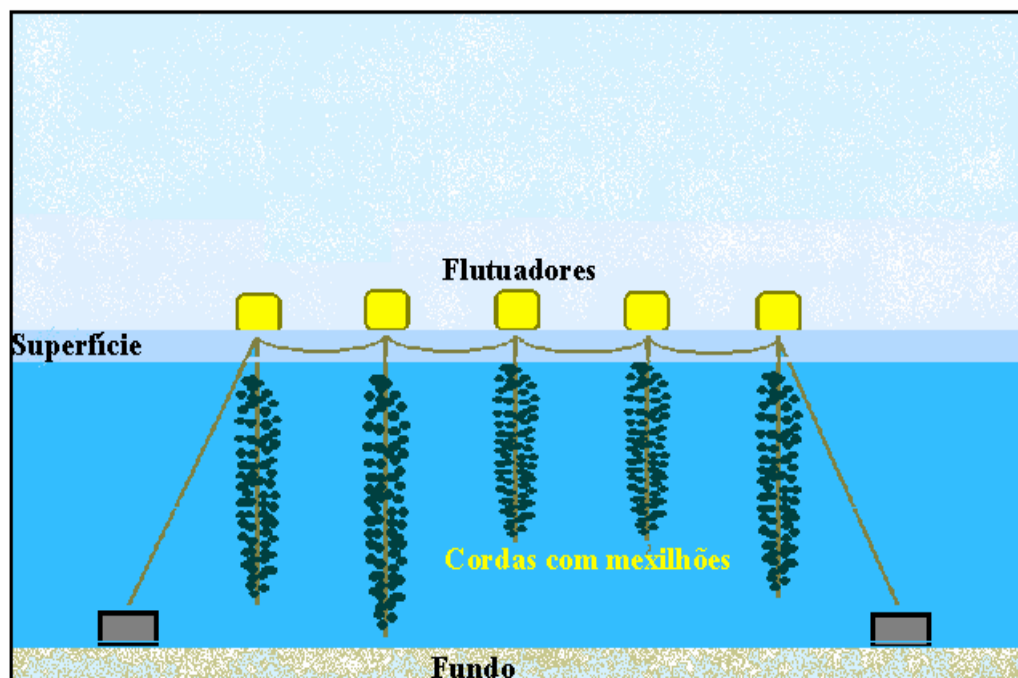
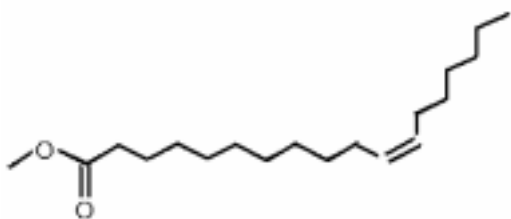
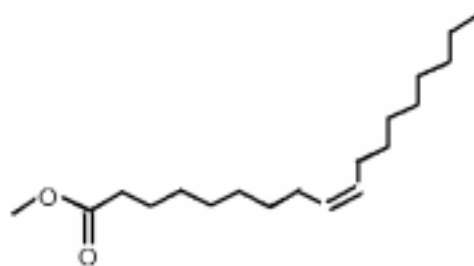


Figura 4. Representação dos espinheis de corda com os mexilhões cultivados no Sambaqui

Anexo IV. Estrutura dos ésteres de ácidos graxos



Éster do ácido oléico – ômega 7



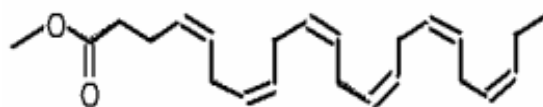
Éster do ácido oléico – ômega 9



Éster do ácido α – Linolênico (ômega 3)



Éster do ácido *cis*-5,8,11,14,17-Eicosapentaenóico (EPA)



Éster do ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenóico (DHA)

